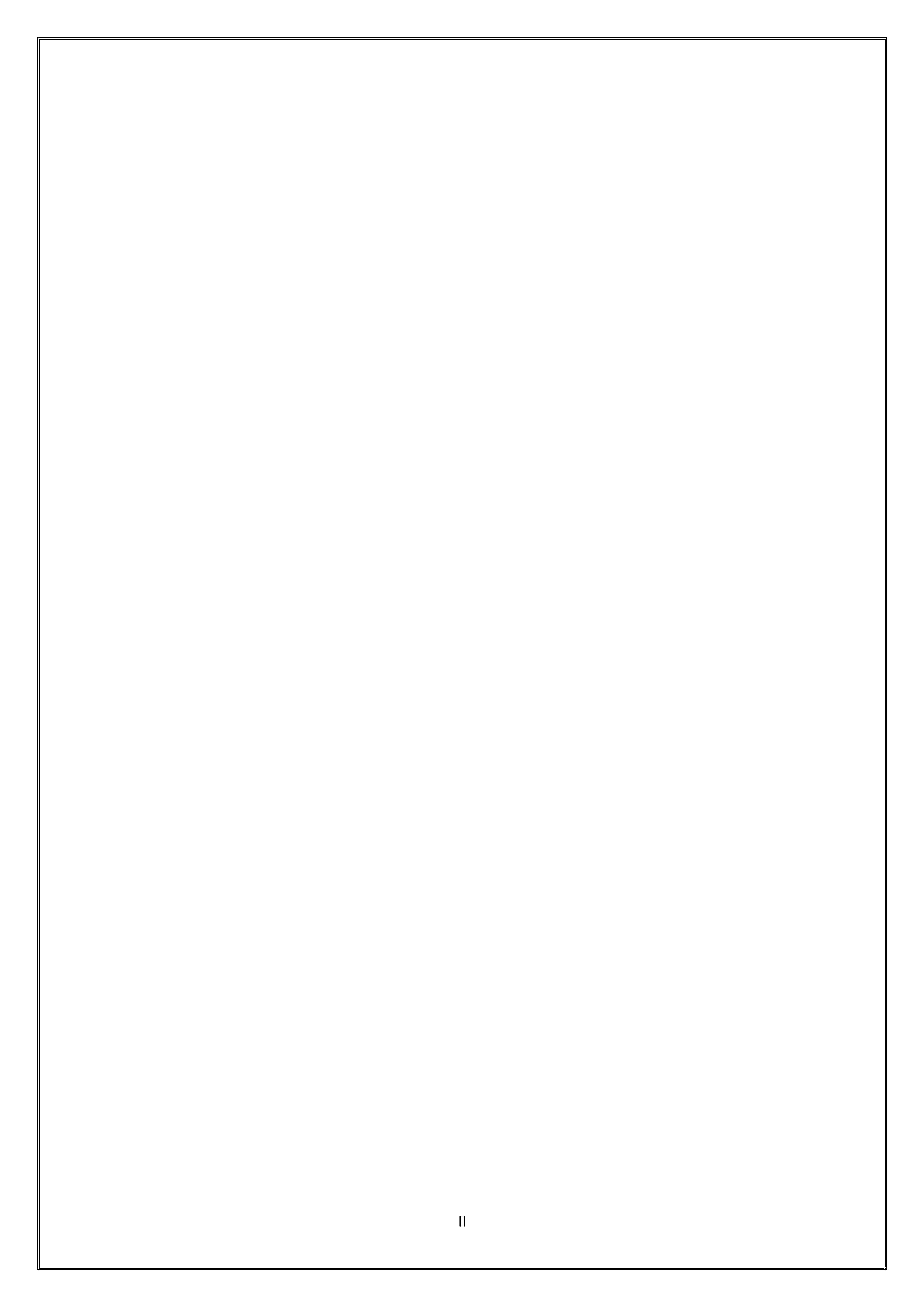
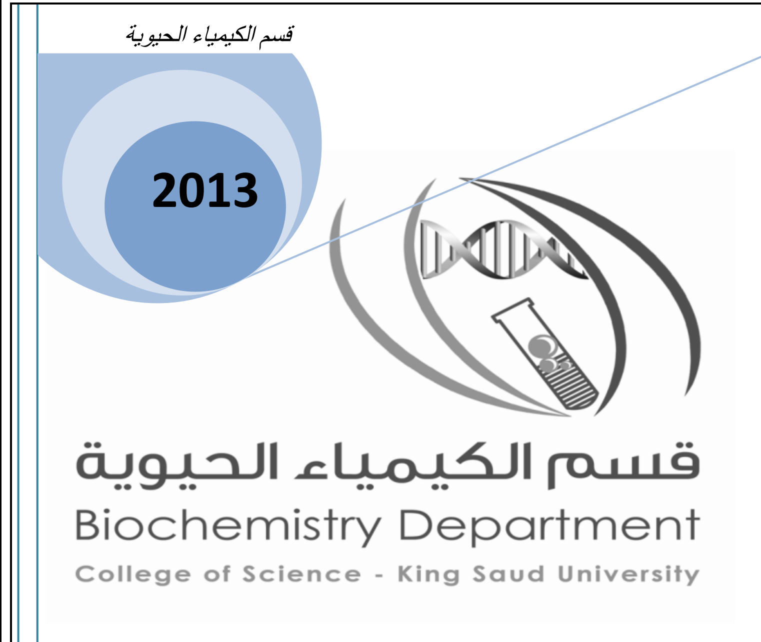

بسم الله الرحمن الرحيم





المملكة العربية السعودية
وزارة التعليم العالي
جامعة الملك سعود
كلية العلوم
قسم الكيمياء الحيوية

مذكرة عملي

101 كيح

محتويات الكتاب

1- السلامة في المختبرات

إن العمل في المختبرات يتطلب وعي كامل بأهمية وخطورة المواد والأجهزة المستخدمة، حيث أن كثير من المواد يتصف بالسمية أو مهيج للأغشية ومن المواد ما هو حارق أو يشتعل وغير ذلك من أشكال الخطورة، لذا يجب قبل البدء في العملالمخبري أن نعي أهمية وخطورة المواد المستخدمة. وأخذ الحيطة والحذر وإتباع تعليمات السلامة الموصى بها بكل مختبر.

1.1.قواعد ومواصفات السلامة في المختبرات:

1- يجب أن تكون مساحة المختبر تتناسب مع أعداد الباحثين والطلاب لكي تسمح لهم بحرية الحركة خلال إجراء التجارب دون تزاحم.
2- يجب أن يتوفر بابان بقاعة المختبر للدخول والخروج وأن يكون اتجاه فتح الأبواب للخارج.
3- تزود النوافذ بستائر مقاومة للحريق وقضبان حماية متحركة.
4- تجهيز المختبرات بوسائل الإضاءة والتهوية الطبيعية والصناعية ومتابعة الصيانة الدورية لتلك التجهيزات.
5- يجب أن تكون أرضيات المختبرات والأحواض والطاولات من أنواع مقاومة للمواد الكيميائية وللحريق.
6- يجب توفير خزانة غازات وذلك لاستخدامها عند تحضير أو استخدام المواد المتطايرة أو الغازات الخطرة أو ذات الرائحة الكريهة.
7- يجب تجهيز المختبر بمقاعد مريحة سهلة الحركة ويمكن التحكم في إرتفاعها.
8- يجب تجهيز المختبرات بعدد كاف من نقاط الكهرباء ذات الأغطية.
9- يجب تجهيز المختبرات بنظام غاز وكهرباء ووضع مفتاح للتحكم في مكان ظاهر يمكن الوصول إليه بسهولة في حالة الطوارئ.
10- يجب أن يزود كل مختبر بغرفة لتخزين الأدوات والأجهزة.
11- يزود كل مختبر بعربة نقل متحركة لنقل الأجهزة والأدوات من غرفة التحضير إلى المختبر وبالعكس.
12- يجب توفير وسائل السلامة الأولية مثل طفايات الحريق وصندوق الإسعافات الأولية ودش غسيل الطوارئ وأجهزة إنذار والاحتفاظ بها بمكان ظاهر وعمل صيانة دورية لها للتأكد من صلاحيتها.

يمكن تقسيم المخاطر في المختبرات إلى:

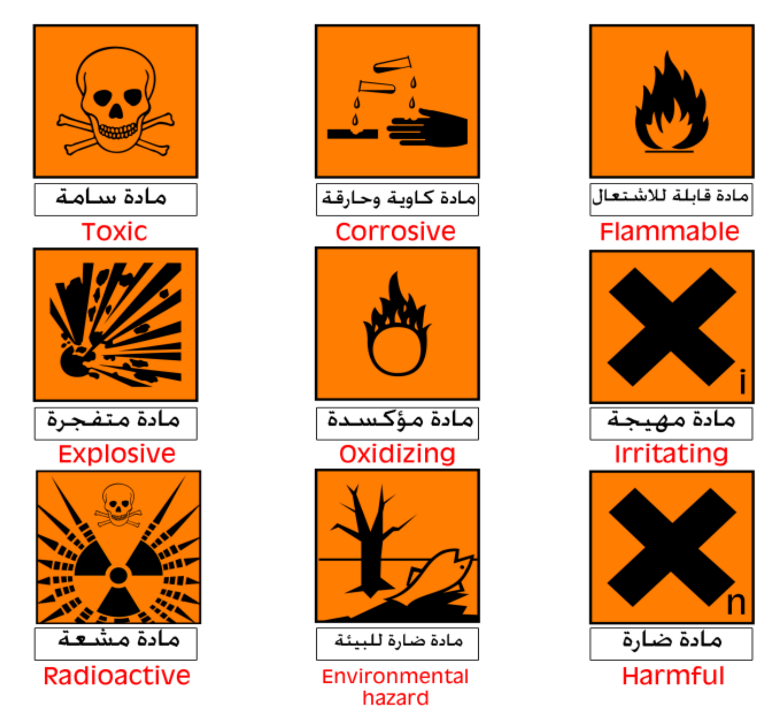
1- مخاطر المواد الكيميائية
2- مخاطر الزجاجيات
3- المخاطر الكهربية
4- مخاطر حيوية.

1.2.احتياطات السلامة من مخاطر الكيماويات:

1- معرفة خصائص المادة الكيميائية من خلال العلامات الإرشادية على العبوة.
2- عدم لمس الكيماويات باليد مباشرةً وعدم تذوقها أو استنشاقها.

3- لبس القفازات والبالطو أثناء العمل
4- عدم استخدام الفم لملء الماصة بل يجب استخدام الضاغطة الهوائية
5- عدم تخزين الكيماويات داخل المختبر ولكن يجب وضعها في أماكن تخزين خاصة.
6- التخلص من بواقي المواد الكيميائية بالطريقة المناسبة لكل مادة حسب إرشادات فني المختبر.
7- إجراء التجارب التي يتصاعد منها غازات أو روائح في غرفة الغازات
8- الحذر عند توجيه انبوبة الاختبار ناحية الوجه أو الجسد أثناء التسخين.
9- إغلاق زجاجات الكيماويات عند الإنتهاء منها وعدم فتح عدة زجاجات في وقت واحد.

1.3.العلامات الإرشادية للمواد الكيميائية



1.4.احتياطات السلامة من مخاطر الزجاجيات

1- تخزين الزجاجيات على رفوف ذات ارتفاع مناسب ليسهل إلتقاطها أو إعادتها.
2- حمل الزجاجيات بطريقة مناسبة وبحذر وعدم حمل أكثر من زجاجة واحدة في المرة الواحدة.
3- عدم استخدام زجاجات غير نظيفة أثناء التجارب.
4- عدم لمس الزجاجات أثناء التسخين باليد مباشرةً ويجب استخدام الماسكات المخصصة لذلك.

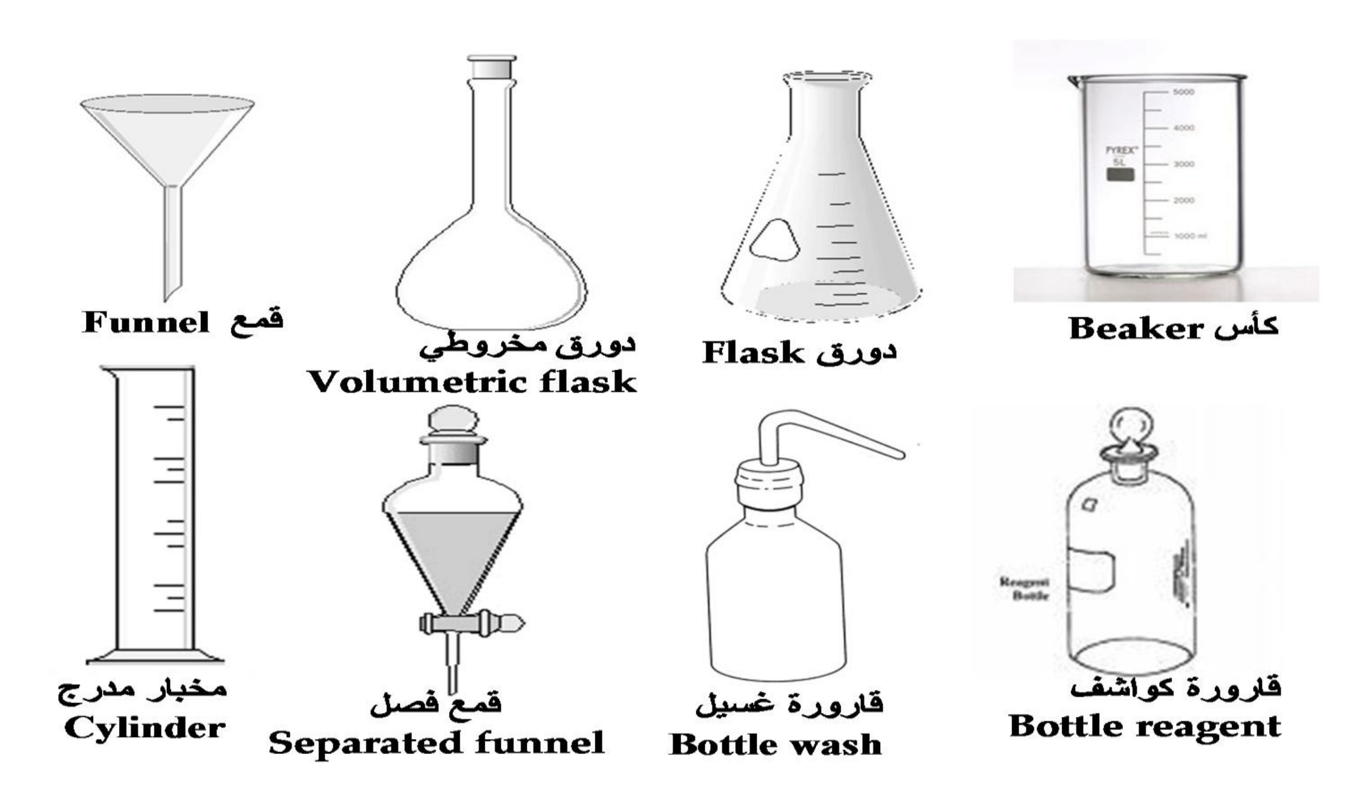
1.5.احتياطات السلامة من المخاطر الكهربائية

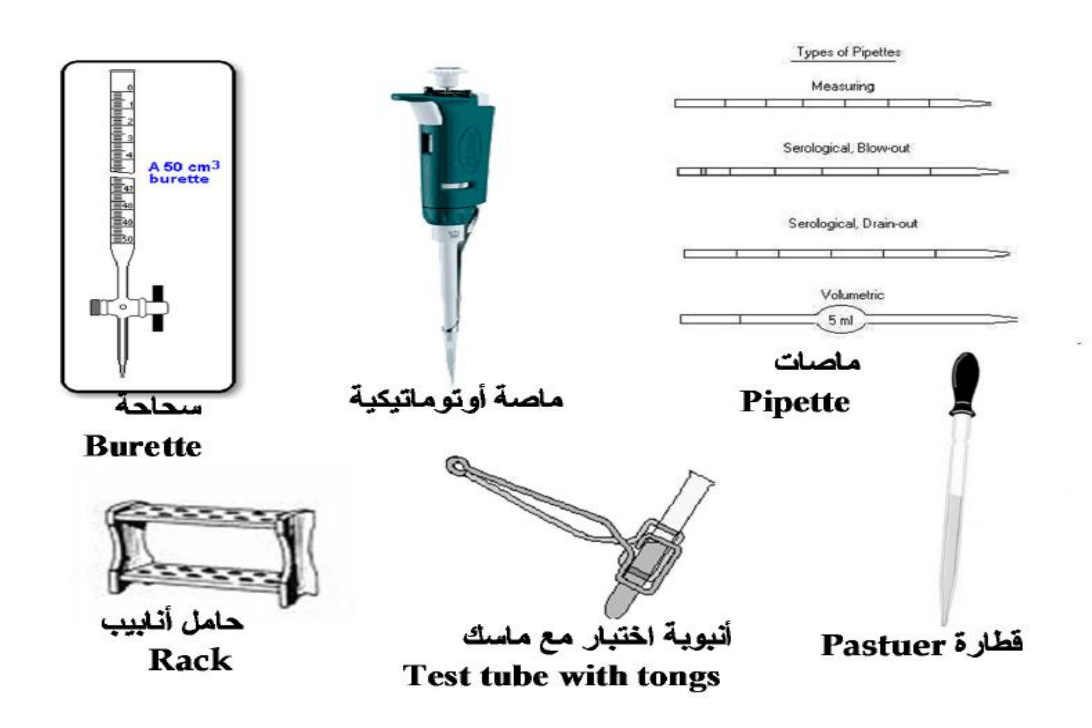
1- يجب أن تكون صنابير المياة بعيدة عن الكهرباء والأجهزة
2- التأكد من خط الكهرباء (110 أو 220 فولت) قبل توصيل الأجهزة
3- صيانة الأجهزة بشكل دوري وتنظيفها
4- مراقبة الأجهزة أثناء التشغيل وإطفاءها بعد الانتهاء من الاستخدام

1.6. إرشادات السلامة في مختبرات قسم الكيمياء الحيوية

1- لبس البالطو لحماية ملابسك وجسمك من الكيماويات المنسكبة
2- لبس القفازات المناسبة عند التعامل مع المواد الكيميائية أو العينات
3- لبس الحذاء الواقي يحميك من الأخطار المحتملة
4- وضع نظاره واقيه لحماية العينين من المواد الكيميائية
5- إزالة الغترة قبل الابتداء في إجراء التجربة
6- تأدية التجربة بحرص وهدوء يقيك من الحوادث
7- تجنب الأحاديث الجانبية مع زملائك أثناء القيام بالتجربة
8- بلغ فني المختبر عن الحوادث مهما كانت صغيرة
9- اسأل الأستاذ عما لا تعرف
10- عدم شم أو استنشاق روائح المواد الكيميائية
11- عدم لمس أو تذوق المواد الكيميائية
12- عدم الأكل أو الشرب داخل المختبرات
13- عدم التدخين داخل المختبرات
14- عدم إخراج المواد الكيميائية من المختبر
15- عدم استعمال أو لمس الأدوات الملوثة بالكيماويات
16- طلب الإسعافات الأولية فورا إذا تعرضت لأي حادث لا سمح الله
17- الالتزام باحتياطيات السلامة الخاصة بكل تجربه
18- إجراء التجارب التي يتصاعد منها غازات في خزانه شفط الغازات
19- استخدام التسخين بالحمام المائي بدلاً من اللهب المباشر
20- سحب السوائل بطريقة آمنه وباستخدام الماصة
21- عدم محاوله فك الزجاجيات المستعصية بالقوة
22- اقرأ علامات التحذير المدونة على الزجاجات قبل لاستعمال
23- غسل اليدين بالماء والصابون دائما بعد الانتهاء من التجربة
24- استخدام المواد المطهرة لتعقيم اليدين
25- استخدام المواد المطهرة لتعقيم المكان بعد استخدام العينات
26- جعل المساحات التي تعمل بها أو عليها نظيفة.

١,٧ . بعض الأدوات المستخدمة في المختبرات



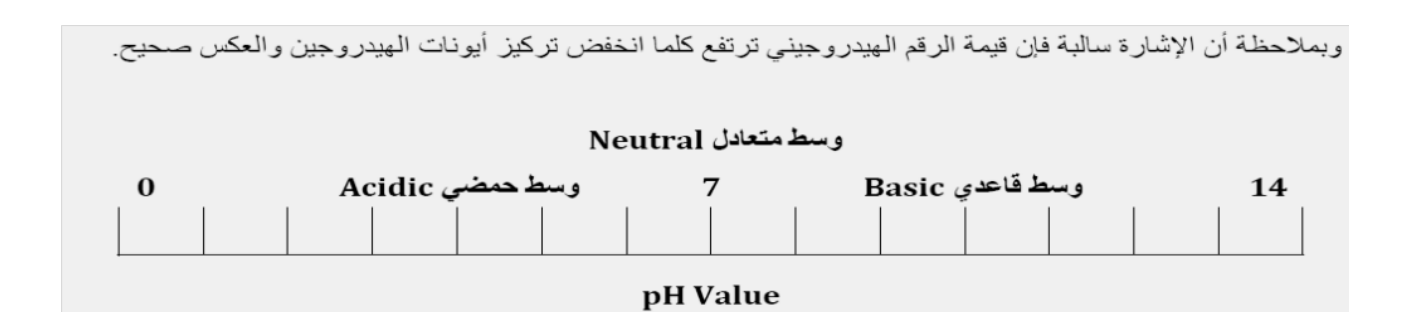


2. المحاليل المنظمة Buffer solution

2.1. الرقم الهيدروجيني pH:

أقترح العالم سورنسن Sorensen طريقة للتعبير عن وسط حموضة المحاليل بإستخدام الرقم الهيدروجيني الذي يعرف بأنه:اللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين $[H^+]$ في المحلول .

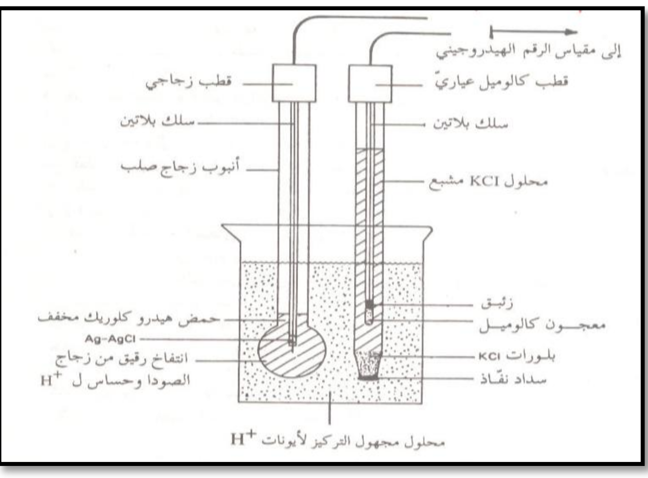
$$pH= -Log[H^+]$$



2.2. قياس الرقم الهيدروجيني :

لقياس الرقم الهيدروجيني للمحاليل بدقة نستخدم جهاز خاص يسمى pH meter. يتكون الجهاز من قطبين:الأول يسمى قطب مرجعي يحتوي على محلول مشبع كلوريد البوتاسيوم يعمل اتصالا كهربائيا بالمحلول، والثاني قطب زجاجي ذو غشاء رقيق على شكل انتفاخ حساس ونفاذ لأيونات الهيدروجين. يقيس هذا الجهاز الفرق في الجهد بين القطبين، ويحوله إلى رقم هيدروجيني من **0** إلى**14** .





2.3. المحاليل المنظمة :

هي المحاليل التي تقاوم التغير في الرقم الهيدروجيني عند إضافة كميات قليلة من الأحماض أو القواعد القوية أو عند تخفيفها، وهي عبارة عن محلول لحمض ضعيف وأحد أملاحه أو قاعدة ضعيفة وأحد أملاحها .

المحاليل المنظمة لها أهمية كبيرة في الأنظمة الكيميائية والبيولوجية بحيث تتميز السوائل الحيوية برقم هيدروجيني ثابت ، ففي جسم الإنسان تختلف قيمة الـ pH من سائل إلى آخر فمثلا في الدم تبلغ 7.4 بينما في العصارة المعدية تبلغ 1.5 ، هذه القيم تعتبر مناسبة ومثالية لعمل الإنزيمات وموازنة الضغط الأسموزي. هذه القيم يحافظ عليها غالبا عن طريق المحاليل المنظمة وأهم المحاليل المنظمة هيالفوسفات والبيكربونات.

وضع العالمان هندرسون – وهاسلبالخ Henderson-Hasselbalch المعادلة الأساسية التي توضح العلاقة بين الرقم الهيدروجيني pH ونسبة الحمض والقاعدة المقترنة. وهذه المعادلة لها أهميتها في فهم عمل وتحضير المحاليل المنظمة.

لنفرض أنه يوجد لدينا محلولا من الحمض الضعيف HA فإن هذا يتفكك لدى إذابته في الماء حسب المعادلة كما يلي:

$$\mathbf{HA} \rightleftharpoons \mathbf{A^- + H^+}$$

**حمض قرين ضعيف		قاعدة قرينة**

وعليه فإن قيمة ثابت التفكك للحمض :

$$\mathbf{Ka} = \frac{[\mathbf{A^-}][\mathbf{H^+}]}{[\mathbf{HA}]}$$

للحصول على قيمة pH تفصل $[\mathrm{H^+}]$ لوحدها في طرف وتأخذ اللوغاريتم لكل الطرفين الناتجين

$$[\mathbf{H^+}]= \frac{\mathbf{Ka[HA]}}{[\mathbf{A^-}]}$$

$$\mathbf{Log[H^+] = log\,Ka \quad \frac{[HA]}{[A^-]}}$$

وبحسب قوانين اللوغاريتمات نحصل على :

$$\mathbf{Log[H^+] = log\,Ka + log\,\frac{[HA]}{[A^-]}}.$$

ويضرب الطرفين بـ (-)

$$\mathbf{- Log[H^+] = -\,log\,Ka - log\,\frac{[HA]}{[A^-]}}$$

معادلة هندرسون – هاسلبالخ $\mathbf{pH = pKa + log\,\frac{[A^-]}{[HA]}}$

$$\mathbf{Or \quad pH = pKa + log\,\frac{[\text{القاعدة القرينة}]}{[\text{الحمض القرين}]}}$$

ويمكن استخدام المعادلة في حساب الرقم الهيدروجيني إذا عرفت نسبة الحمض إلى القاعدة المقترنة و pK للحمض.

من المعادلة السابقة نجد أن الرقم الهيدروجيني للمحلول المنظم يعتمد على عاملين هما :

1 – قيمة pK

2 – النسبة بين تركيز الحمض والقاعدة المقترنة

2.4. سعة المحلول المنظم (أو كفاءته) Buffer Solution Capacity

تعبر عن مدى مقاومة المحلول المنظم للتغير في الرقم الهيدروجيني، وتكون أكبر ما يمكن عندما تكون النسبة بين الحمض والقاعدة المقترنة مساوية للواحد.

من الأمثلة:حمض الخليك (CH_3COO^-) acetic acid كحمض ضعيف وقاعدته المقترنة هي خلات الصوديوم sodium acetate (CH_3COONa^+)

2.5. تحضير محلول منظم فوسفاتي Preparation of Phosphate Buffer

المطلوب:تحضير محلول منظم فوسفاتي تركيزه 0.25M و pH=7.4 و (pKa =7.2)

1 – معرفة مكونات المحلول المنظم وهي:

فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين NaH_2PO_4 ويعتبر الشق الحمضي (Acid)

فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4 ويعتبر الشق القاعدي (القاعدة المقترنة أو الملح Salt)

2 – حساب النسبة بين الحمض والملح باستخدام معادلة هندرسون كالتالي :

$$pH = pKa + \log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$7.4 = 7.2 + \log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$7.4 - 7.2 = +\log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$0.2 = +\log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$\frac{Na2HPO4}{NaH2PO4} = 1.6$$

3 – حساب وزن كلا المادتين كالتالي :

وزن NaH_2PO_4 = $\frac{1}{2.6}$x0.25x الوزن الجزيئي

= .... جرام

وزن NaH_2PO_4 = $\frac{1.6}{2.6}$x0.25x الوزن الجزيئي

= .... جرام

4 – يذاب وزن كلا المادتين في حوالي 500 ml من الماء المقطر في كأس زجاجي .

5 – يقاس الـ pH للمحلول باستخدام جهاز pH meter، ثم يضبط على الـ pH المطلوب وذلك بإضافة حمض أو قاعدة .

6 – توضع الكمية في دورق حجمي سعة (1L) ثم نكمل الحجم إلى واحد لتر (1000 ml) بالماء المقطر، و يرج جيدا.

2.6. دراسة خواص المحاليل properties of Buffer solution

الفكرة الأساسية:

هل يتغير الرقم الهيدروجيني (pH) للمحلول المنظم تغيراً كبيرا أم يقاوم التغير في الرقم الهيدروجيني عند إضافة حمض أو قاعدة إليه مقارنة ذلك بما يحدث عند إضافة الحمض أو القاعدة إلى الماء المقطر

المواد والأدوات المطلوبة:

1 – كاسين (سعة كل منهما 50 ml) ومحرك زجاجي

2 – جهاز القياس الهيدروجيني pH meter

3 – محلول منظم فوسفاتي رقمه الهيدروجيني pH=7.4 (المحضر بالجزء العملي السابق)

4 – حمض هيدروكلوريك HCl مخفف تركيزه 0.1 M

5 – محلول هيدروكسيد صوديوم NaOH مخفف تركيزه 0.1 M

طريقة العمل:

أولا: دراسة خواص المحاليل المنظمة باستخدام حمض الهيدروكلوريك HCl 0.1 M

1- ضع في كأس (أ) 40 ml من الماء المقطر وفي كأس آخر (ب) 40 ml من المحلول المنظم الفوسفاتي (الذي تم تحضيره بالجزء العملي)
2- يقاس الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات كل من الكاسين باستخدام الجهاز الخاص بذلك
3- أضف لمحتويات كل من الكأسين كمية معينة من حمض الهيدروكلوريك المخفف ، وحرك كل من المحلولين جيدا بمحرك زجاجي نظيف
4- يقاس الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات كل من الكأسين مرة أخرى
5- أعد الخطوة رقم 3 بإضافة كمية أخرى من حمض هيدروكلوريك المخفف مرة أخرى لمحتويات كل كاس ، وحرك المحلولين جيدا بمحرك زجاجي .
6- يقاس الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات كل كأس مرة أخرى .

النتائج:

	حجم الحمض المضاف volume of HCl 0.1 M	قيمة الـ pH للمحلول المنظم بعد الإضافة	قيمة الـ pH للماء المقطر بعد الإضافة
١	0.5 ml		
٢	1 ml		
٣	2 ml		
فرق التغير في الـ pH بعد الإضافة			

الأسئلة:

من خلال نتائج الجدول ، أكمل الجمل التالية :

- نقص الـ pH بعد إضافة الحمض للمحلول المنظم بمقدار .... ، بينما نقص pH بعد إضافة الحمض للماء المقطر بمقدار ....
- أيهما تغير له الـ pH بدرجة كبيرة ؟

....

....

- أيهما قاوم التغير في الـ pH ؟

....

....

<u>ثانياً: دراسة خواص المحاليل المنظمة باستخدام قاعدة هيدروكسيد الصوديوم NaOH 0.1 M</u>

- ملاحظة:أعد التجربة السابقة مع استبدال حمض الهيدروكلوريك بقاعدة هيدروكسيد الصوديوم
- النتائج :

	حجم القاعدة المضافة volume of NaOH 0.1 M	قيمة الـ pH للمحلول المنظم بعد الإضافة	قيمة الـ pH للماء المقطر بعد الإضافة
١	0.5 ml		
٢	1 ml		
٣	2 ml		
فرق التغير في الـ pH بعد الإضافة			

من خلال نتائج الجدول ، أكمل الجمل التالية :

- يزيد pH بعد إضافة القاعدة للمحلول المنظم بمقدار .... ، بينما يزيد pH بعد إضافة القاعدة الماء المقطر بمقدار ....
- أيهما تغير له الـ pH بدرجة كبيرة ؟

....

....

- أيهما قاوم التغير في الـ pH ؟

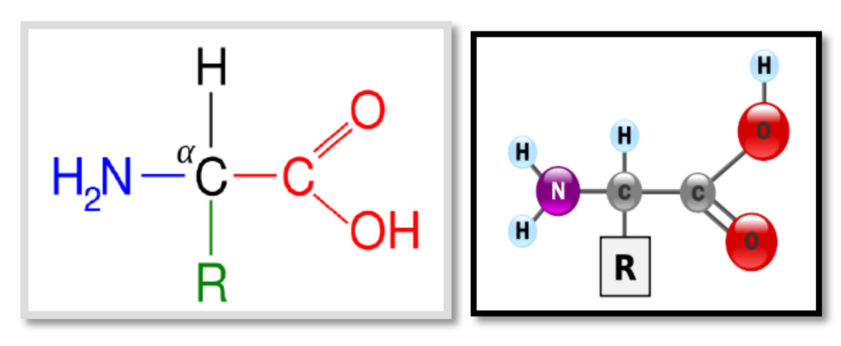
....

....

3 .الأحماض الأمينية

Amino Acids

الأحماض الأمينية هي الوحدات الأساسية لبناء البروتينات . وهناك عشرون حمض أميني تم اكتشافها في الطبيعة. كل حمض أميني يحتوي على الأقل على مجموعة أمين (NH_2) ومجموعة كربوكسيل (COOH) ومجموعة طرفية R (تختلف من حمض إلى آخر) وذرة هيدروجين .



تختلف الأحماض الأمينية باختلاف المجموعة الطرفية ولذا أمكن تقسيم الأحماض الأمينية تبعاً لقطبية تلك السلاسل الجانبية (R-group) في المحاليل المائية إلى :

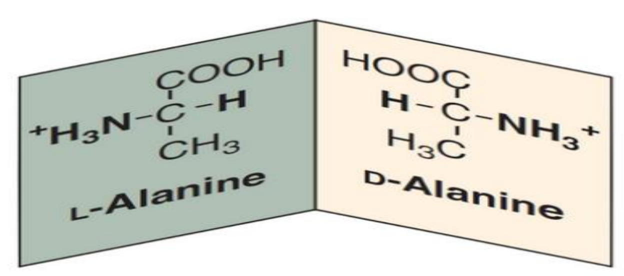
1- مجموعة غير قطبية non polar.
2- مجموعة مستقطبة متعادلة الشحنة uncharged polar .
3- مجموعة قطبية موجبة الشحنة Basic polar (positively charged).
4- مجموعة قطبية سالبة الشحنة Acidic polar (Negatively charged).

3.1.الخواص الكيميائية و الفيزيائية للأحماض الأمينية:

3.1.1.النشاط الضوئي:

تتميز الأحماض الأمينية بقدرتها على عمل انحراف لاتجاه الضوء المستقطب لاحتوائها جميعاً (باستثناء الجليسين) على ذرة كربون غير متماثلة (asymmetrical) مرتبطة بأربع مجاميع مختلفة أو أكثر.

لذا فإن جميع الأحماض الأمينية ذات نشاط ضوئي فتحرف الضوء المستقطب الموجه إليها إما إلى اليمين أو إلى اليسار وتتميز جميع الأحماض الأمينية المكونة للبروتين بأنها من النوع L والمقصود بذلك هو ترتيب المجموعات حول ذرة الكربون الغير متناسقة وليس اتجاه الإنحراف، فالنوع يعني أنه عندما تكون مجموعة الكربوكسيل لأعلى فإن مجموعة الأمين توجد ناحية اليسار.



3.1.2.الخاصية الأمفوتيريةونقطة التعادل الكهربي:

جميع الأحماض الأمينية تتميز بالخاصية الأمفوتيرية أي أنها عندما تذوب في الماء فإنها تحمل شحنتين (شحنة موجبة وأخرى سالبة) مكونة ما يسمى بالأيون مزدوج الشحنة Zwitter ion وتعمل كحمض (معطي للبروتونات) وكقلوي (مكتسب للبروتونات) في نفس الوقت، حيث تكتسب مجموعة الكربوكسيل الشحنة السالبة (COO^--) لسهولة فقدها البروتون بينما تكتسب مجموعة الأمين الشحنة الموجبة (NH_3^+-) لسهولة ارتباطها بالبروتون المنفصل عن مجموعة الكربوكسيل. إن وجود هذه الحالة من التأين المزدوج يجعل الحمض الأميني قادراً على أن يسلك سلوك الأحماض لوجود مجموعة (COO^-) وكالقواعد لوجود مجموعة (NH_3^+).

يحمل الحمض الأميني الشحنة الموجبة في الوسط الحمضي و يحمل الشحنة السالبة في الوسط القاعدي.

$$R-\underset{NH_3^+}{\underset{|}{CH}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-OH \rightleftharpoons R-\underset{NH_3^+}{\underset{|}{CH}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^- \rightleftharpoons R-\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O^-$$

low pH   neutral pH   high pH

وعلية فإن تغيير الأس الهيدروجيني pH للوسط الذي يوجد فيه الحمض الأميني يؤدي إلى تغير محصلة الشحنات عليه و بالتالي على حركته في المجال الكهربي.

<u>نقطة التعادل الكهربى :</u>

هي درجة الأس الهيدروجيني pH الذي تتساوى فيه عدد الشحنات الموجبة والسالبة على الحمض الأميني، بمعنى أن تكون محصلة الشحنات تساوي الصفر، وعندها لا يتحرك الحمض الأميني لأي من القطبي السالب أو الموجب إذا وضع في مجال كهربي وبناءً عليه فإنه يترسب بسهوله عند هذه الدرجة.

3.1.3.درجة الإنصهار:

وجود الروابط الأيونية القوية بين جزيئات الحمض الأميني لتكوين البلورات يجعلها صعبة الإنصهار فيحتاج إلى تعريضها لدرجات حرارة عالية تصل إلى (200°م) فما فوق.

3.2الاختبارات العامة و الوصفية للأحماض الأمينية (Qualitative tests of amino acids)

3.2.1.اختبار الذوبانية (solubility of amino acid):

يهدف هذا الإختبار إلى اختبار ذوبان الأحماض الأمينية في المحاليل القطبية و الغير قطبية و الأحماض و القواعد للإستدلال على السلوك القطبي و الخاصية الأمفوتيرية.

النظرية العلمية للاختبار:

تذوب الأحماض الأمينية في الماء لارتباط جزيئاتها المستقطبة بجزيئات الماء القطبية، ووجود المجموعات NH_3^+ القاعدية و COO^- الحمضية تسهل ذوبان الأحماض الأمينية في القواعد و الأحماض.

الأدوات والمواد:

الأحماض الأمينية:جليسين , جلوتامين , لايسيين

المذيبات:الماء , الكلوروفورم , هيدروكسيد الصوديوم , حمض الهيدروكلوريك

أنابيب إختبار

طريقة العمل:

1- ضع في 4 أنابيب 5 مل من كل من المذيبات المذكورة .
2- أضف 0,5 جم من الأحماض تحت الاختبار (مع تغيير محتوى الأنابيب عند تغيير الحمض تحت الاختبار في كل مرة).
3- دون الملاحظات في الجدول

الأحماض / الأنبوب	النتيجة			الإستنتاج
	جليسين	جلوتامين	لايسيين	
1- ماء				
2- كلوروفورم				
3- هيدروكسيدالصوديوم				
4- حمض الهيدروكاوريك				

مناقشة النتائج:

....

....

....

الأسئلة:

مستعين بتركيب كل حمض ، اي الأحماض يذوب في المذيبات المذكورة؟ ولماذا؟

....

....

....

....

....

....

من دراسة الاستنتاج، على ماذا تدل هذه التجربة؟

....

....

....

....

....

3.2.2.اختبارات النهيدرين (Ninhydrin test):

يهدف هذا الإختبار إلى التأكد من أن الأحماض الأمينية α تعطي لون بنفسجي مع النهيدرين .

النظرية العلمية للاختبار:

يتفاعل النهيدرين مع جميع الأحماض الأمينية من النوع α (حيث مجموعة الأمين NH_2– مرتبطة بذرة الكربون α) عند درجات حرارة عالية لتكوين الهيدرين دانتين و النشادر و يتصاعد ثاني أكسيد الكربون. ثم يتفاعل الهيدرين دانتين والنشادر مع جزئ من النهيدرين معطياً متراكب بنفسجي اللون. يستثنى الحمض الأميني البرولين حيث يعطي لون أصفر. هذا الاختبار إيجابي مع النشادر و الأمينات و الببتيدات و كذلك البروتينات.

Ninhydrin
نهيدرين
+
Amino acid
حمض أميني
$R-C(H)(NH_2)-COOH$ → $R-C(=O)-H + CO_2$
Hydrindantin
هيدرين دانتين
+
NH_3
Ninhydrin → $3H_2O$
Purple pigment
مركب بنفسجي

Cysteine Glycine Proline

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة (amino acid solution), تحضر بإضافة 100جم من الحمض الأميني في 100 مل من الماء المقطر.
- محلول النهيدرين (Ninhydrin solution), يحضر بإذابة 200 مجم في 100مل من الإيثانول.
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1. أضف في كل أنبوب 1 مل من محلول الحمض الأميني المجهول.

2. أضف 1 مل على كل أنبوبة من محلول النِنهيدرين.
3. رج جيداً ثم نضعها في حمام مائي حتى الغليان.
4. دون الملاحظات.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج

مناقشة النتائج:

....

....

....

الأسئلة:.

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟

....

....

....

....

ما هو الحمض الأميني الذي يعطي اللون الاصفر بدلاً من ا لبنفسجي مع ه ذا الاختبا ر ؟ وماهو السبب ؟

....

....

....

3.2.3.الكشف عن الأحماض الأمينية المحتوية على الكبريت :

هذا الإختبار مميز للأحماض الأمينية المحتوية على مجموعة الكبريت مثل: السيستين , الميثونين .

الهدف من الاختبار: تحديد الأحماض الأمينية التي تحتوي مجموعات كبريت في سلاسلها الطرفية.

النظرية العلمية للاختبار:

تسخين الأحماض الأمينية التي تحتوي على كبريت مع هيدروكسيد الصوديوم (قاعدة) يحول الكبريت العضوي الى كبريت غير عضوي و الذي يتفاعل مع أسيتات الرصاص معطياً راسب أسود من كبريتيد الرصاص

$$HS-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH + 2\,NaOH \longrightarrow HO-CH_2-\underset{H}{\overset{NH_2}{C}}-COOH + Na_2S + H_2O$$

$$Pb(CH_3COO)_2 + 2\,NaOH \longrightarrow Pb(OH)_2 + 2\,CH_3-COOH$$

$$Pb(OH)_2 + 2\,NaOH \longrightarrow Na_2pbO_2 + 2\,H_2O$$

$$Na_2S + Na_2PbO_2 + 2\,H_2O \longrightarrow PbS\downarrow + 4\,NaOH$$

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة، تحضر بإذابة 100جم من الحمض الأميني في 100 مل من الماء المقطر.
- هيدروكسيد الصوديوم (10%NaOH).
- أسيتات الرصاص (5%lead acetate).
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1. ضع في كل أنبوب 1 مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
2. أضف 1 مل من هيدروكسيد الصوديوم.
3. أضف 0,5 مل من أسيتات الرصاص, ثم رج جيداً.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
السستين		
المثيونين		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟ و أكتب الصيغة البنائية لهذه الأحماض ؟

....

....

....

ما التركيب الكيميائي للراسب الأسود الذي يتكون من هذا الاختبار؟

....

....

....

3.2.4.إختبار ميلون (Million test):

الهدف من الاختبار: إختبار خاص بالكشف عن مجموعة الهيدروكسي فينيل.

النظرية العلمية للاختبار:

تتفاعل مجموعة الهيدروكسي فينيل في الحمض الأميني التيروسين مع كاشف ميلون (وهو عبارة عن أيونات الزئبق مذابة في أحماض النترات) فيتكون راسب بني محمرّ من أملاح الزئبق . هذا الكشف إيجابي أيضاً مع مركبات الفينول.

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة: تحضر بإذابة 100جم من الحمض الأميني في 100مل من الماء المقطر.
- كاشف ميلون (Million reagent) يحضر بإذبة 100جم من نترات الزئبق (mercuric nitrate $Hg(NO_3)_2$) في 140مل من حمض النتريك (nitric acid HNO_3), ثم يسخن في غرفة الغازات، ثم يخفف بإضافة ضعف حجمه ماء مقطر.
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1- ضع في كل أنبوب 1مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
2- أضف 1مل من كاشف ميلون على كل أنبوبة
3- رج جيداً ثم ضعها في حمام مائي يغلي لمدة دقيقتين (مع الحذر).
4- دون الملاحظات

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتائج إيجابية مع هذا الاختبار؟

....

....

....

.ما هي المجموعة الوظيفية المسئولة عن إعطاء النتيجة الإيجابية؟ وهل تقتصر هذه النتيجة على الأحماض الأمينية؟ ولماذا؟

....

....

....

....

3.2.5.إختبار الزانثوبروتييك (Xanthoprotic test):

يستخدم هذا الإختبار للكشف عن حلقة البنزين و التي تميز الأحماض الأمينية الأروماتية.

النظرية العلمية للاختبار:

تتفاعل الأحماض الأمينية الأروماتية (التربتوفان- الفينيل آلانين - التيروسين) مع حمض النيتريك المركز عند درجات حرارة عالية (بالتسخين) لتعطي مركبات النيترو الصفراء التى تعطي اللون البرتقالي بإضافة هيدروكسيد الصوديوم (محلول قلوي).

Tyrosine + c. HNO_3 ⟶

Trptophan + c. HNO_3 ⟶

Phenylalanine + c. HNO_3 ⟶ ✕

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة، تحضر بإذابة 100جم من الحمض الأميني في 100مل من الماء المقطر.
- حمض النيتريك المركز.
- هيدروكسيد الصوديوم (10%NaOH).
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1- ضع في كل أنبوبة 1 مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
2- أضف 1 مل من حمض النتريك المركز.
3- رج جيداً بحذر ثم أضف قطرات من هيدروكسيد الصوديوم.
4- دون الملاحظات

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
التربتوفان		
الفينيل آلانين		
التيروسين		

مناقشة النتائج:

....

....

....

الأسئلة:

ما هي الأحماض الأمينية التي تعطي نتائج إيجابية مع هذا الاختبار؟

....

....

....

ما هي المجموعة الوظيفية المسئولة عن إعطاء النتيجة الإيجابية؟ وهل تقتصر هذه النتيجة على الأحماض الأمينية؟ ولماذا؟

....

3.2.6.إختبار سكاجوتشي (Sakaguchi test) :

يستخدم هذا الإختبار للكشف عن مجموعة الجوانيدين في الأحماض الأمينية .

الهدف من الاختبار: التعرف على حمض الأرجينين و تمييزه عن باقي الأحماض الأمينية.

النظرية العلمية للاختبار:

تتفاعل مجموعة الجوانيدين الموجودة في حمض الأرجنين مع α نافثول في وجود الهيبوبروميت كعامل مؤكسد فيعطي متراكب أحمر اللون يدل على وجود هذه المجموعة.

المواد و الأدوات:

- محاليل أحماض أمينية مجهولة و الذي يحضر بإذابة 100جم من الحمض الأميني في 100مل من الماء المقطر.
- هيدروكسيد الصوديوم (10%NaOH).
- α- نافثول (α- naphthol) في 10% الإيثانول .
- محلول هيبوبروميت الصوديوم (5%sodium hypobromate).
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1- ضع في كل أنبوبة 1 مل من محلول الحمض الأميني المجهول.
2- أضف 2مل من هيدروكسيد الصوديونم ثم رج جيداً.
3- أضف 2مل من α- نافثول ثم رج جيداً.
4- أضف 0.5 مل من هيبوبروميت الصوديوم.
5- دون الملاحظات

- النتائج:

الأنبوبة	النتيجة	الإستنتاج

الأسئلة:

أكتب الصيغة البنائية للأحماض الأمينية التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟

....

....

....

....

فسر أهمية إضافة محلول هيبوبروميت الصوديوم ؟

....

....

....

....

....

دون نتائج التجارب السابقة على كل من الأحماض الأمينية في الجدول:

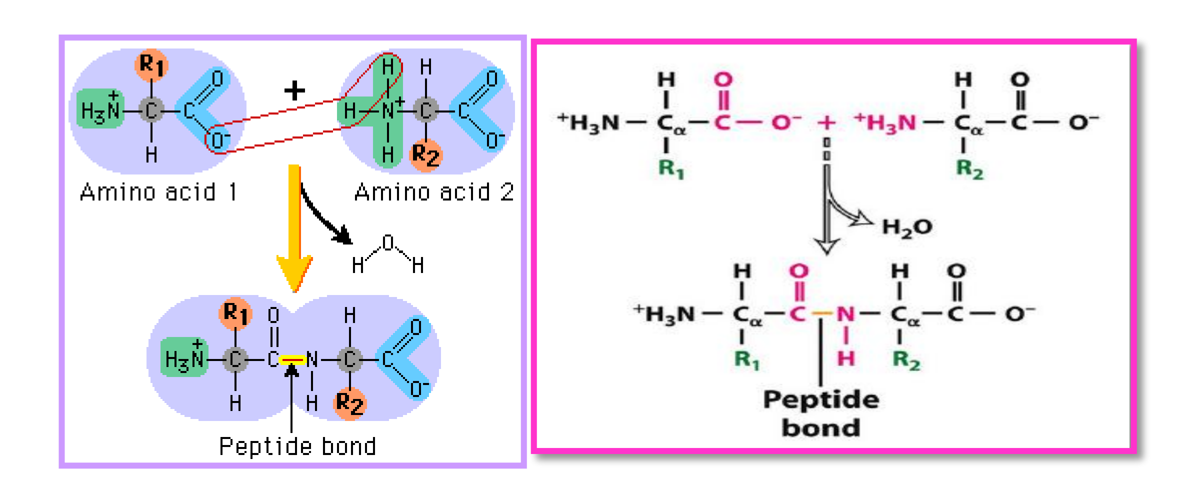
نتيجة الاختبار / الحمض الأميني	النهيدرين	ميلون	الكبريت	ساكاجوشي	الزانثوبروتيك
جلايسين Glycine					
سيرين Serine					
برولين Proline					
تربتوفان Tryptophan					
تيروسين Tyrosine					
فينيل آلانين Phenylalanine					
أرجينين Arginine					
سيستين Cysteine					

4. البروتينات Protein

البروتينات مركبات عضوية ذات أوزان جزيئية كبيرة و هي عبارة عن سلاسل من الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها البعض بروابط ببتيدية.

تلعب البروتينات دوراً هاماً في جسم الكائن الحي حيث تدخل في تركيب العديد من المواد البيولوجية المتخصصة مثل الأجسام المضادة و الإنزيمات و بعض الهرمونات، كما تساعد في نقل السيالات العصبية والتحكم في التعبير الجيني و هي المكون الأساسي للأنسجة الحية.

يتكون البروتين من سلسلة من الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها بروابط ببتيدية و فيها ترتبط مجموعة الكربوكسيل في حمض أميني مع مجموعة الأمين في حمض أميني آخر مع إزالة جزئ ماء.



تختلف البروتينات عن بعضها البعض في بنائها الكيميائي تبعاً لعدة عوامل:

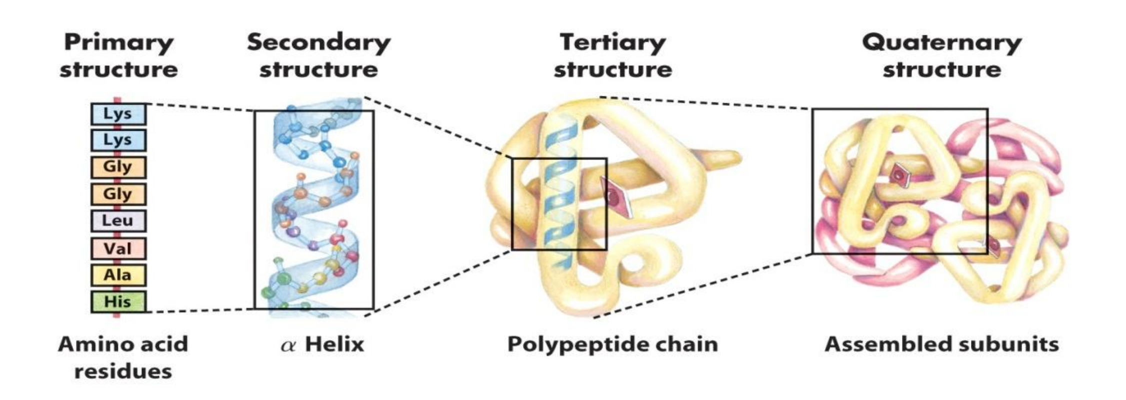
- عدد ونوع الأحماض الأمينية المكونة لسلاسلها الببتيدية .
- ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية.
- إرتباط البروتين مع جزيئات أخرى غير بروتينية.

4.1 الأشكال البنائية للبروتين :

تأخذ السلاسل الببتيدية المكونة للبروتين أشكالاً فراغية ناتجة عن إلتفاف تلك السلاسل معطية أربعة تراكيب بنائية.

1. التركيب البنائي الأولي Primary structure:يعبر عن تسلسل وتتابع الأحماض الأمينية المرتبطة مع بعضها البعض بروابط ببتيدية.
2. التركيب البنائي الثانوي Secondary structure:ينتج عن تكوين روابط هيدروجينية بين المجموعات الطرفية R group للأحماض الأمينية مع بعضها البعض مما يتسبب في إلتفاف والتواء السلسلة الببتيدية مكونة إما شكل الصفحة المطوية B-sheet او الشكل الحلزوني alpha helix.

3. التركيب البنائي الثلاثي Tertiary structure:ينتج عن تكوين روابط هيدروجينية بين المجموعات الطرفية R group للأحماض الأمينية البعيدة عن بعضها مكونة الشكل الثلاثي الأبعاد.
4. التركيب الرباعي Quaternary structure. وفيه ترتبط وحدات مختلفة أو متشابهة من السلاسل الببتيدية (subunits) مع بعضها البعض لتكون الشكل الرباعي الأبعاد للبروتين. مثال جزئ الهيموجلوبين المتكون من أربعة وحدات مرتبطة معاً.



والبروتينات في هذا التركيب تصبح قادرة على أداء وظائف بيولوجية. وتشبه البروتينات في خصائصها الفيزيائية والكيميائية تلك الخصائص التي تتميز بها الأحماض الأمينية المكونة لها، لذا فللبروتينات خاصية أمفوتيرية في تفاعلها مع الأحماض فتحمل شحنة موجبة بينما مع القواعد نجد أنها تكتسب شحنة سالبة، ولذا فإن حركتها في المجال الكهربي تعتمد على قيمة pH للوسط. تبتدأ السلسلة الببتيدية المكونة للبروتينات بالطرف الأميني الحر البروتينات وتنتهي بالطرف الكربوكسيلي.

4.2. نقطة التعادل الكهربي للبروتين :

هي الأس الهيدروجيني pH التي يكون عندها محصلة الشحنات على الجزئ تساوي صفر. نتيجة لتساوي الشحنات الموجبة والسالبة على جزئ البروتين وعند هذه النقطة يصبح البروتين أقل كثافة وأقل ذوبانية فيسهل ترسيبه، وتختلف نقطة التعادل الكهربي من بروتين إلى آخر حسب الأحماض الأمينية المكونة له.

4.3. الاختبارات الوصفية للبروتينات (Qualitative tests of proteins)

4.3.1. ذوبان البروتينات (solubility of proteins):-

- البروتينات الليفية مثل الكيراتينات غير قابلة للذوبان بينما البروتينات الكروية تمثل القسم الأعظم و قابلة للذوبان في المذيبات القطبية و الأحماض و القلويات بدرجات مختلفة.
- تكون البروتينات مع الماء محاليل غروية نظراً لكبر حجم جزيئات البروتين، بينما في الوسط الحمضي فغالباً ما تكتسب الجزيئات الشحنة الموجبة فتتنافر، أما في الوسط القاعدي فتكتسب جزيئات البروتين الشحنة السالبة فتصبح أيضاً قابلة للذوبان.

الهدف من الاختبار: إختبار السلوك الأمفوتيري و الخاصية القطبية لجزيئات البروتين.

المواد و الأدوات:

- محاليل بروتينات:

(1) البيومين (2%albumin) , و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).

(2) محلول جيلاتين (1%gelatin).

(3) محلول كازين (1%casein).

- محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1% NaOH).
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1- اختبر ذوبان كل من البروتينات (البيومين، جيلاتين، كازين) في كل من الماء البارد و الماء الحار و محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1% NaOH).
2- سجل قابلية ذوبان كل من البروتينات في جدول النتائج .
3- دون ملاحظاتك وناقش ما لاحظته

النتائج:

البروتين	نوع البروتين	قابلة الذوبان في الماء البارد	قابلة الذوبان في الماء الحار	قابلة الذوبان في1%NaOH
البيومين	بسيط			
كازين	مرتبط			
جيلاتين	مشتق			

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

....

الأسئلة:

بما تفسر اختلاف درجات الذوبان من بروتين لآخر؟

....

....

....

....

....

....

4.3.2. إختبار البيوريت (Biuret test):

إختبار عام على البروتينات الذائبة و الصلبة. يهدف هذا الاختبار التعرف على البروتينات وتمييزها عن بقية المواد كالكربوهيدرات و الليبيدات.

النظرية العلمية للاختبار:

يتفاعل البروتين مع محلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي فيعطي نتيجة إيجابية فقط عند وجود رابطتين ببتيديتين فأكثر في جزئ االبروتين. فيتفاعل أيون النحاسيك مع مجموعتي (-CO , -NH) في الرابطة الببتيدية مكوناً متراكباً بنفسجي اللون و قد تم تسمية هذا المركب بإسم مركب بيوريت لأن البيوريت هو المركب الغير بروتيني الوحيد الذي يعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار.

المواد و الأدوات:

- محاليل بروتينات:
  - البيومين (2%albumin)، و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).
  - محلول جيلاتين (1%gelatin).
  - محلول كازين (1%casein).
- كبريتات النحاس (2% $CuSO_4$)، يحضر بإذابة 2جم من كبريتات النحاس في 100مل ماء مقطر.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (10% NaOH).
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل:

1- ضع في كل أنبوبة 1مل من محلول البروتين.
2- أضف 2مل من هيدروكسيد الصوديوم و رج جيداً.
3- أضف 0.5 مل من كبريتات النحاس و رج جيداً.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
البيومين		
جيلاتين		
كازين		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ماهي البروتينات التي تعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار؟

....

....

....

....

....

4.3.3. أثر الأملاح على ذوبانية البروتين (precipitation of proteins by salts):

يتم ترسيب البروتينات بإستخدام المحاليل المركزة للأملاح و يتميز كل بروتين بتركيز معين للملح يترسب عنده فيتم فصله عن البروتينات الأخرى في المحلول و تسمى هذه العملية بـ salting out

الهدف من الاختبار: بيان أن التراكيز القليلة من الملح قد تساعد على ذوبان البروتينات بينما التراكيز العالية تسبب ترسيب البروتين.

النظرية العلمية للاختبار:

التراكيز المنخفضة من الملح تساعد على إستقرار جزيئات البروتين و إذابته نتيجة للتجاذب بين أيونات الملح و المجموعات الفعالة في البروتين. بينما في التراكيز العالية فإن أيونات الملح تنافس جزيئات البروتين على الإرتباط بجزيئات الماء فيقل إستقرار البروتين مما يؤدي الى ترسيبه. وبالرغم من ترسيب البروتينات إلا أنها تحافظ على خصائصها ونشاطها بعد إذابتها وبالتالي فإن هذه الطريقة تستخدم لتنقية البروتينات من محاليلها.

المواد و الأدوات المطلوبة:

- البيومين (2%albumin) , و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).
- محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).
- ماء مقطر.
- محلول مشبع من كبريتات الأمونيوم (767جم/لتر).
- ملح كبريتات أمونيوم (صلب).

طريقة العمل:

1- ضع الألبيومين في كاس و أضف 300مل ماء.
2- يتم إضافة محلول مشبع أو الملح الصلب لكبريتات الأمونيوم بكميات مختلفة.
3- يفصل الراسب بالطرد المركزي (300 rpm) ويحدد وزن الراسب.
4- دون النتائج في الجدول.

النتائج :

البروتين	البيومين+300مل ماء	يفصل بالطرد المركزي	إضافة محلول كبريتات أمونيوم مشبع	إضافة كبريتات الصوديوم
ألبيومين				
جلوبيولين				

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ما درجة التشبع التي يترسب عندها الجلوبيولين؟

....

....

....

....

....

كيف تفسر أن البروتين لا يترسب عند تركيزات قليلة من الملح ويزداد ترسبه كلما زاد تركيز الملح؟

....

....

....

....

....

4.3.4. ترسيب البروتينات بأملاح المعادن الثقيلة (precipitation of proteins by salts of heavy metals)

تستخدم هذه الطريقة لفصل البروتينات و تفتيتها دون النظر الى نشاطها الحيوي .

الهدف من الاختبار:

التعرف على تأثير أملاح الفضة و الزئبق على طبيعة تركيب البروتينات و نشاطها الحيوي، وإيضاح خطورة التسمم بالرصاص، وإيضاح إمكانية إستخدام البروتينات (الألبيومين) كعلاج في حالات التسمم بالزئبق و الرصاص.

المواد و الأدوات المطلوبة:

- محاليل بروتينات:
  - البيومين (2%albumin) و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).
  - محلول جيلاتين (1%gelatin).
  - محلول كازين (1%casein).
- نترات الفضة (2% Silver nitrate $AgNO_3$)، تحضر بإذابة 2جم من نترات الفضة في 100 مل ماء المقطر.
- كلوريد الزئبق (5%mercury chloride $HgCl_2$).
- أنابيب إختبار نظيفة.

طريقة العمل :

1- ضع في كل أنبوب 1مل من محلول البروتين.
2- أضف 0.5 مل من نترات الفضة.
3- كرر الخطوات السابقة مع إستبدال نترات الفضة بكلوريد الزئبق و نقارن النتيجة.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
البيومين		
جيلاتين		
كازين		

مناقشة النتائج:

....

....

....

4.3.5. الترسيب بالأحماض القوية(precipitation of proteins by strong acids):

الهدف من التجربة:

- الكشف عن البروتين في البول بواسطة حمض النيتريك المركز.
- فصل البروتين في محلول ما.
- لإيقاف النشاط الإنزيمي.

النظرية العلمية للاختبار:

تواجد البروتينات في وسط حمضي يكسبها شحنة موجبة فتجذب جزيئات البروتين إلى أيونات الحمض (NO_3) و تعمل على ترسيبها.

المواد و الأدوات المستخدمة:

- حمض نيتريك مركز.
- البيومين (2%albumin) و يحضر من بياض البيض الطازج بإذابته في محلول كلوريدالصوديوم (1%NaCl).
- محلول كلوريد الصوديوم (1%NaCl).
- ثلاثي كلوريد حمض الخليك (TCA).

طريقة العمل:

- **في الأنبوبة الأولى**ضع 2 مل من حمض النيتريك المركز في أنبوب اختبار مع المحافظة على وضع الأنبوبة بشكل مائل
- أضف محلول الألبيومين قطرة قطرة على جدار الأنبوبة ولاحظ تكون الراسب.
- أضف زيادة من الحمض ولاحظ التغيرات في الراسب.
- **في الأنبوبة الثانية** أضف 2 مل من محلول البيومين مع المحافظة على وضع الأنبوبة بشكل مائل،
- أضف ثلاثي كلوريد حمض الخليك قطرة قطرة على جدار الأنبوبة ولاحظ تكون الراسب.
- أضف زيادة من الحمض و لاحظ تغيرات الراسب.

النتائج:

	النتيجة	الإستنتاج
مع حمض النيتريك		
مع ثلاثي كلوريد حمض الخليك		

- دون نتائج التجارب السابقة على كل من البروتينات في الجدول:

البروتين / الاختبار	البيومين	جيلاتين	كازين
الذوبانية			
البيوريت			
نترات الفضة			
كلوريد الزئبق			
حمض الخليك			
حمض TCA			

4.4. التقدير الكمي للبروتينات Quantitative Proteins Estimation

تقدير البروتينات كمياً يساعد على معرفة التراكيز القياسية لبروتينات معينة كما أن له دلالات تشخيصية عند إرتفاع أو انخفاض تركيز البروتينات عن المستوى الطبيعي, وله أهمية في معرفة المحتوى البروتيني للعينات الغذائية.

تعتبر مقدرة الجزيئات على امتصاص أطياف الضوء من أكثر الطرق الكيموحيوية المستخدمة في تقدير كميات الجزيئات في محاليلها، ومن هذه الجزيئات المهمة على مستوى الخلية الحية هي البروتينات التي لها القدرة على الإمتصاص الضوئي لوجود بعض الأحماض الأمينية الحلقية العطرية (تربتوفان – فينيل ألانين - تيروسين).

هناك أجهزة خاصة لقياس امتصاص الطيف الضوئي تسمى اسبكتروفوتوميتر (spectrophotometer) يمكن من خلالها تقدير البروتينات عند طول موجي معين.

4.4.1. طريقة لاوري (Lowry method)

تقدير البروتينات بطريقة لاوري هي من الطرق الشائعة و ذلك لسهولتها و سرعة إجرائها و كذلك لحساسيتها العالية فهي تستخدم في تقدير البروتينات المخففة عندما يكون تركيزها منخفض.

و تعتبر طريقة لاوري تطوير و مشتقة من طريقة بيوريت للكشف عن البروتينات.

النظرية العلمية للاختبار:

عند معاملة البروتين بمحلول كبريتات النحاس في وسط قاعدي فإن أيون النحاسيك يكون معقد مع الرابطة الببتيدية في البروتين ويسمى معقد بيوريت، وهذا المعقد يختزل محلول فولن (الذي يتكون من أملاح معقدة من تنجستنات فوسفومليبيدات) ليعطي لون أزرق يمكن قياس الإمتصاص الضوئي له عند طول موجي 750nm.

يجب إعداد منحنى قياسي(standard curve) لبروتينات معلومة التراكيز وذلك لإستخدامه في تقدير البروتينات مجهولة التراكيز.يمكن من المنحنى القياسي حساب تركيز البروتينات المجهولة بمعرفة مقدار الإمتصاص الضوئي لها.

المواد و الأدوات المطلوبة:

- محاليل البيومين سيرم الدم معلومة التراكيز، تحضر بتراكيز (50, 100, 150, 200, 250 ug/ml) .
- محلول بروتين مجهول التركيز (تحضر في نطاق التراكيز المعلومة).
- محلول (a) يحتوي على كربونات الصوديوم ($2\%Na_2Co_3$), وهيدروكسيد الصوديوم (0.1 M NaOH).
- محلول (b) يحتوي على كبريتات النحاسيك ($0.5\%CuSO_4$) و طرطرات الصوديوم و البوتاسيوم (1% sodium potassium tartarate).
- محلول كبريتات النحاس القاعدية، وينتج عن خلط 50مل من محلول (a) من 1مل من محلول (b) ويجب أم يتم الخلط بين المحلولين قبل إجراء التجربة مباشرة.
- محلول فولن، يجب تخفيف المحلول التجاري بالماء المقطر بنسبة 1:1 قبل الإستعمال.
- جهاز سبكتروفوتوميتر و يضبط على طول موجي 750 nm .
- ماصات أتوماتيكية
- أنابيب إختبار نظيفة عدد 8 أنابيب.

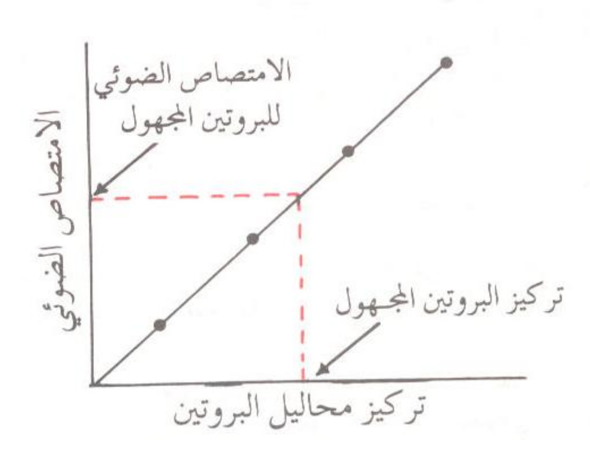
طريقة العمل: ضع مجموعة من أنابيب الإختبار وأتبع الجدول التالي :

المحلول	رقم الأنبوبة							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ماء مقطر	1 مل							
البروتين القياسي 50 ug/ml		1 مل						
البروتين القياسي 100 ug/ml			1 مل					
البروتين القياسي 150 ug/ml				1 مل				
البروتين القياسي 200 ug/ml					1 مل			
البروتين القياسي 250 ug/ml						1 مل		
البروتين المجهول A							1 مل	
البروتين المجهول B								1 مل
محلول كبريتات النحاس القاعدية	5 مل	5 مل	5 مل	5 مل	5 مل	5 مل	5 مل	5 مل
رج الأنابيب لمزج محتوياتها و ننتظر 10 دقائق								
كاشف فولن	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل	0.5 مل
رج الأنابيب لمزج محتوياتها و ننتظر 10 دقائق								
قياس الإمتصاص الضوئي عند طول موجي 750 nm								

النتائج :

الأنبوبة	تركيز البروتين ug/ml	الإمتصاص الضوئي عند 750nm
1	0	
2	50	
3	100	
4	150	
5	200	
6	250	
A	بروتين مجهول A	
B	بروتين مجهول B	

- إرسم منحنى قياسي يوضح العلاقة بين تركيز البروتين (على المحور الأفقي) و الإمتصاص الضوئي (على المحور الرأسي) وذلك على ورقة رسم بياني.
- إستنتج من الرسم البياني تركيز محلول البروتين المجهول وذلك بمعلومية الإمتصاص الضوئي له.



ملاحظة: إذا لم يرد عمل منحنى قياسي نكتفي بتحضير محلول بروتيني قياسي واحد فقط ثم نستخدم المعادلة الحسابية التالية لحساب تركيز محلول بروتيني مجهول:

تركيزمحلول البروتين المجهول= (مقدار الإمتصاص الضوئي لمحلول البروتين المجهول X التركيز تركيز محلول البروتين القياسي) / مقدار الإمتصاص الضوئي لمحلول البروتين القياسي

الأسئلة:

ما نوع العلاقة بين تركيز البروتين و الإمتصاص الضوئي له ؟

....

....

....

....

قارن بين قيمة تركيز البروتين المجهول المستنتجة بواسطة المنحنى القياسي أو المعادلة الحسابية؟ و أيهما أدق في النتيجة؟

....

....

....

....

5.الإنزيمات. Enzymes

الوظيفة الأساسية التي تقوم بها الخلايا الحية في الكائن الحي هي إنشاء مركبات معقدة من مواد بسيطة والعكس ، أي تفكيك تلك المركبات المعقدة إلى مواد أبسط ، إن هذه القدرة التي تتمتع بها الخلايا على تكوين مواد عضوية معقدة من مواد أخرى أبسط تركيباً (أو العكس) تحتاج لعدد كبير من التفاعلات الكيميائية المختلفة، وتخضع هذه التفاعلات لآليات تتحكم في سرعتها واتجاهها عن طريق جزيئات متخصصة تسمى الإنزيمات، التي يعتمد عملها على تسريع التفاعلات الكيميائية داخل الخلية وتنظيمها بدقة بحسب حاجة الخلايا .

فالإنزيمات عوامل مساعدة عضوية حيوية تصنع داخل الخلية ، تقوم بعملها من خلال تحفيز التفاعلات داخل الخلية بطريقة تخصصية، أي أن كل إنزيم يقوم بتنشيط تفاعل محدد أو أكثر من خلال العمل على مادة معينة أو مجموعة مواد متشابهة كيميائياً دون غيرها، فالتخصص ؛ رغم إختلاف درجة تفاوته من إنزيم لآخر؛ يحمي مادة الخلية نفسها ومكوناتها من الهدم، مع ملاحظة أن عملية التنشيط التي يقــوم بها الإنزيم تعني أن الإنزيم لا يتفاعل بنفسه ولا يتأثر بناتج التفاعل.

تتركب الإنزيمات في تكوينها من بروتينات بغض النظر عن اسمها ويمكن تقسيمها من حيث التركيب إلى نوعين :

1- الإنزيمات البسيطة: وهي كأي بروتينات بسيطة عبارة عن سلسلة من الأحماض الأمينية المتتالية .
2- الإنزيمات المرتبطة: وهي التي تتكون من شقين ، أحدهما بروتيني والآخر غير بروتيني . علماً بأن المجموعات غير البروتينية هي جزء من المركز الفعّال في الإنزيم، وتسمى في هذه الحالة باسم " المرافق الإنزيمي " Co-Enzyme أو بالعامل المعاون Co-Factor ، وهذه الأجزاء غير البروتينية ضرورية لنشاط هذه الإنزيمات .

5.1.العوامل المؤثرة في نشاط الإنزيمات :

1- تركيز الإنزيم.
2- تركيز المادة الداخلة في التفاعل التي يعمل عليها ذلك الإنزيم.
3- درجة الحرارة التي يحدث فيها التفاعل.
4- درجة الأس الهيدروجيني للوسط (قيمة pH) .
5- وجود مواد مثبطة (inhibitors) تعيق عمل الإنزيم أو تقلل نشاطه الحيوي.

5.2.مبدأ دراسة نشاط الإنزيمات بطريقة عملية :

لنتذكر ماسبق قوله من أن الإنزيم لا يدخل في التفاعل، ولهذا فإن دراسة نشاطه عملياً تتم من خلال قياس وتتبع المواد المتفاعلة ومدى نقصها أو اختفائها، وكذلك باختبار ظهور نواتج التفاعل أو زيادتها. فمن الواضح أن إختفاء المواد المتفاعلة أو نقصها، وظهور نواتج التفاعل أو تزايدها يدل على أن الإنزيم نشط في تحفيزه للتفاعل في الظروف المناسبة للتفاعل .

5.3.الاختبارات الوصفية للكشف عن نشاط بعض الإنزيمات Qualitative tests of Enzyme activity :

5.3.1. الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيمات:

النظرية العلمية للاختبار:

سبق في دراسة البروتينات معرفة الكاشف العام لها ، فقد أجري اختبار البيوريت ، والمبدأ هنا أن نجري التجربة المذكورة على محاليل إنزيمات ، فإن ظهرت نتيجة إيجابية نكون قد تحققنا من أن الإنزيم عبارة عن بروتين في طبيعته الكيميائية .

المواد والأدوات :

- محلول إنزيم الأميليز و محلول إنزيم السكريز .
- محلول كبريتات النحاس2% $CuSO_4$. • محلول هيدروكسيد الصوديوم 10% NaOH .
- أنابيب اختبار نظيفة .

طريقة العمل :

1- ضع في أنبوبة 1 مل من إنزيم الأميليز ، وفي أنبوبة أخرى 1 مل من أنزيم السكريز .

2- أضف لكل منهما 2 مل من هيدروكسيد الصوديوم ، ورجّ جيداً

3- أضف 0.5 مل من كبريتات النحاس ، ورجّ جيداً .

النتائج-

الأنبوبة	المشاهدة	الاستنتاج
إنزيم الأميليز		
أنزيم السكريز		

الاسئلة:

أكمل الفراغات التالية :

- الكاشف العام على البروتينات هو اختبار ....

- نستنتج من النتائج السابقة أن الإنزيمات عبارة عن مواد .... ، لأنها أعطت نتيجة .... مع اختبار البيوريت .

- جميع الإنزيمات عبارة عن .... ، بينما ليس جميع البروتينات ....

5.3.2. إنزيم الأميليز α-Amylase :

تفرزه الغدد اللعابية في الفم، ليقوم بتحليل النشاإلى سكريات أحادية (جلوكوز) ، من خلال تفاعل يأخذ عدة خطوات :

$$\textbf{Starch} \xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}} \textbf{Glucose}$$

هدف الاختبار:

-متابعة نشاط إنزيم ألفا أميليز.

النظرية العلمية للاختبار:

في هذه التجربة سوف يتم تحضير مستخلص خام من إنزيم الاميليزمن اللعاب.

والأس الهيدروجيني الأمثل لنشاطه هو 6.7.

ونختبر بقاء النشا أواختفاءه ، وكذلك نختبر ظهور الجلوكوز من عدمه. هذا وسبق أن درسنا اختبار اليود لفحص وجود النشا ، واختبار بينديكت للسكر الأحادي المختزل .

المواد والأدوات :

- أنابيب اختبار نظيفة .
- محلول نشا 1% starch .
- محلول إنزيم الأميليز من اللعاب Salivary Amylase :
  يحضر بمضمضة الفم بالماء عدة مرات ووضعه في كأس صغير.
- محلول اليود Iodine Solution :
  يذاب 25 مجم من اليود في 100 مل من محلول يوديد البوتاسيوم 2% .
- كاشف بينيديكت .
- محلول كبريتات النحاس2% $CuSO_4$.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم 10% NaOH

طريقة العمل:

1- حضر 3 أنابيب اختبار (أ، ب، ج)
2- حضر كل أنبوبة كما يلي:
<u>أنبوبة (أ):</u>

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي

15 نقطة من محلول النشا

أنبوبة (ب):

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي

15 نقطة من الماء المقطر

أنبوبة (ج):

15 نقطة من محلول ا لنشا

15 نقطة ماء مقطر

3- ضع في حمام مائي درجة حرارته 37 درجة مئوية لمدة دقيقتين
4- يُجرى اختبار اليود لمعرفة بقاء النشا أو اختفاءه .
5- يُجرى اختبار بينيديكت لمعرفة ظهور الجلوكوز أم لا ، مع ملاحظة أن كاشف بينيديكت يحتاج غليان بعد إضافته لمدة 3 دقائق .

النتائج-

الأنبوبة	الاختبار		
الأنبوبة الأولى	اليود (أ)		
	بينيديكت (ب)		
الأنبوبة الثانية	اليود (أ)		
	بينيديكت (ب)		
الانبوبة الثالثة	اليود (أ)		
	بينيديكت (ب)		

تحليل النتائج :

- في حالة الأنبوبة التي لم يتغير فيها لون اليود وهو البني، فإننا نستنتج إختفاء النشا، أي أنه تكسر إلى الجلوكوز ، وهذا يدل على أن الإنزيم فعّال وسليم، ودفع بالتفاعل في هذه الحالة حتى اختفى النشا.
- إذا تغير لون كاشف البينيديكت إلى اللون البني أو الأحمر الغامق (أو راسب خفيف) فيعني ذلك ظهور سكريات مختزلة، أي أن النشا تحلل إلى جلوكوز، وهو مايدل على أن الإنزيم فعّال وسليم.

إذا بقي لون كاشف بينيديكت أزرق كما هو، فمعناه أنه لم تنتج سكريات أحادية مختزلة، أي أن النشا بقي سليماً لم يتأثر لعدم وجود الأنزيم.

سؤال : في أي الحالتين وجدت أن الإنزيم غير قادر على تحليل النشا ؟ ولماذا ؟

....

....

....

5.3.3. إنزيم السكريز(Sucrase (Invertase :

أحد إنزيمات العصارة المعويّة التي تفرزها خلايا الأمعاء الدقيقة ليقوم بتحليل السكروز (سكر ثنائي) إلى الجلوكوز والفركتوز (سكريات أحادية).

$$\text{Sucrose} \xrightarrow{\text{Sucrase}} \text{Glucose + Fructose}$$

النظرية العلمية للاختبار:

السكروز سكر ثنائي غير مختزل، متكون من إرتباط جزيئين مختلفين من سكريات مختزلة (الجلوكوز والفركتوز)، يتحلل تحت تأثير إنزيم السكريز، ويمكن الكشف عن نشاط هذا الإنزيم بالكشف عن تكون سكريات مختزلة وذلك عن طريق تجربة بينيديكت .

المواد والأدوات :

- محلول السكروز 10% .
- محلول إنزيم السكريز ، يحضر من الخميرة .
- كاشف بينيديكت .

طريقة العمل :

1- ضع في حامل أنبوبتين نظيفتين، وضع في كل منهما 1 مل من محلول إنزيم السكريز .
2- ضع إحداهما في حمام مائي يغلي، واتركها تغلي مدة 10 دقائق على الأقل (الأنبوبة الأولى) ، بينما يجب أن تبقى الأخرى بدون غليان (الأنبوبة الثانية).
3- بعد أن تُبرد الأنبوبة الأولى بفتح صنبور الماء عليها قليلاً، أضف إلى الأنبوبتين كلتيهما 2 مل من محلول السكروز مع الرّج .

4- ضعهما في حمام مائي درجة حرارته 37 درجة مئوية لمدة دقيقتين .
5- يُجرى اختبار بينيديكت على الأنبوبتين لمعرفة ظهور السكريات المختزلة (الجلوكوز والفركتوز)، مع ملاحظة أن كاشف بينيديكت يحتاج غليان بعد إضافته لمدة 3 دقائق ؛ كما سبق في درس السكريات .

النتائج-

الأنبوبة حالة الإنزيم	المشاهدة	الاستنتاج
الأنبوبة الأولى (سكروز + إنزيم السكريز الذي تعرض للغليان)		
الأنبوبة الثانية (سكروز + إنزيم السكريز)		

تحليل النتائج :

- إذا تغير لون كاشف بينيديكت إلى اللون البني أو الأحمر الغامق (أو راسب خفيف) فيعني ذلك ظهور سكريات مختزلة، أي أن السكروز تحلل إلى جلوكوز وفركتوز، وهو مايدل على أن الإنزيم فعّال.
- إذا بقي لون كاشف بينيديكت أزرق كما هو، فمعناه أنه لم تنتج سكريات أحادية مختزلة ، أي أن السكروز بقي سليماً لم يتأثر لعدم فعالية الإنزيم، لأن هذا الأخير جرى تدميره بالغليان في بداية التجربة .

5.3.4. إنزيم بولي فينول أكسيديز Polyphenol Oxidase

الغرض من التجربة:

1-متابعة نشاط الإنزيم من مستخلص خام محضر من البطاطا.

2-الكشف عن الطبيعة الكيميائية للإنزيم.

3-دراسة الخصوصية الإنزيمية تجاه مادة التفاعل Substrate.

4-دراسة أثر درجات الحرارة المختلفة على نشاط الإنزيم.

النظرية العلمية للاختبار:

في هذه التجربة سوف يتم تحضير مستخلص خام من إنزيم بولي فينول أكسيديزPolyphenol Oxidase. يحتوي هذا الإنزيم على النحاس، والأس الهيدروجيني الأمثل لنشاطه هو 6.7. هذا الإنزيم يعتبر عامل مساعد في عملية الأكسدة لثاني وثلاثي هيدروكسي الفينول إلى quinons كما في التفاعل الآتي:

Catechol (د) $+ 1/2 O_2$ —Polyphenol Oxidase→ Benzo quinone $+ H_2O$

تفاعل الأكسدة والاختزال هذا يصاحبه تغير في اللون، كما أن هذا التفاعل نصادفه كثيراً في الطبيعة حيث هو المسؤول عن اللون البني الذي يظهر على البطاطا بعد تقشيرها.

سنتابع في هذه التجربة تطور التفاعل الإنزيمي بطريقة بسيطة وكيفيته وذلك بواسطة التغير في اللون وسيعبر عنه كما هو موضح هنا.

درجة كثافة اللون في أنبوبة الاختبار	الرمز
عديم اللون	(-)
لون باهت	(+)
لون واضح	(++)
لون غامق	(+++)

كثافة اللون الناتج يتناسب طردياً مع النشاط الإنزيمي في أنبوبة الاختبار التي تحت الفحص.

5.3.4.1. اختبار النشاط الإنزيمي للبولي فينول أكسيديز:

1- حضر 3 أنابيب اختبار (أ، ب، ج)
2- حضر كل أنبوبة كما يلي:

أنبوبة (أ):

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي

15 نقطة من محلول الكاتيكول 0.01مول/لتر

أنبوبة (ب):

15 نقطة من المستخلص الإنزيمي

15 نقطة من الماء المقطر

أنبوبة (ج):

15 نقطة من محلول الكاتيكول 0.01مول/لتر

15 نقطة ماء مقطر

3- ضع الأنابيب الثلاثة في حمام مائي 37 ^{o} م
4- رج كل أنبوبة 5 دقائق لتهويتها وذلك لإضافة الأوكسجين للمحلول.
5- عرض الأنابيب للضوء كل 5 دقائق بعد الرج وافحصها ثم سجل اللون الذي شاهدته في كل أنبوبة تبعاً للرموز المعطاة سابقا. استمر في الفحص لمدة 25 دقيقة.

النتائج:

زمن التحضين بالدقائق	كثافة اللون +++،++،+		
	أ	ب	ج
0			
5			
10			
15			
20			
25			

5.3.4.2. إختبار الطبيعة الكيميائية لإنزيم بولي فينول أكسيديز:

1- حضر 4 أنابيب (أ، ب، ج، د)
2- حضر كل أنبوبة كما يلي:

أنبوبة (أ):

15 قطرة من المستخلص الأنزيمي

15 قطرة من الكاتيكول

رج الأنبوبة وضعها في حمام مائي 37 ^{o} م لمدة 10 دقائق. ضع هذه الأنبوبة على جنب كمقياس بحيث تقارن فيه نتائج كلاً من ب، ج، د

أنبوبة (ب):

أضيف 10 قطرات من المستخلص الإنزيمي

أضيف 10 قطرات من التربسين

رج الأنبوبة جيداً ثم ضعها في حمام مائي 37 ^{o}م لمدة 10 دقائق

أضيف 10 قطرات من محلول الكاتيكول ثم أعدها إلى نفس الحمام المائي لمدة 10 دقائق. افحص الأنبوبة وقارنها بأنبوبة أ.

دون مشاهدتك.

أنبوبة (ج):

أضيف 10 قطرات من المستخلص الأنزيمي

أضيف 10 قطرات من ثلاثي كلورو حمض الخليك

رج الأنبوبة جيداً ثم انتظر 5 دقائق بعد ذلك أضف 10 قطرات من محلول الكاتيكول

ضع الأنبوبة في حمام مائي 37 ^{o}م لمدة 10 دقائق وقارن الأنبوبة بأنبوبة أ.

أنبوبة (د):

أضيف 15 قطرة من المستخلص الأنزيمي

أضيف بضعة بلورات من phenyl thiourea

رج الأنبوبة جيداً واستمر في الرج لمدة 5 دقائق

ثم أضف 15 قطرة من محلول الكاتيكول

ثم ضع الأنبوبة في حمام مائي عند 37 ^{o}م لمدة 10 دقائق

قارن هذه الأنبوبة مع أنبوبة أ. سجل مشاهدتك بالجدول الخاص بالنتائج.

إنزيم التربسين هو إنزيم يعمل على تحلل البروتينات وذلك بواسطة تحليله للروابط الببتيدية.

ثلاثي كلورو حمض الخليك يستخدم عادة في المعامل حيث يعمل على مسخ "تغير طبيعة البروتينات denaturation" ويعمل على ترسيبها شاملاً في ذلك الإنزيمات

مادة phenyl thiourea لها ميل كيميائي قوي تجاه عنصر النحاس فبإمكانه الارتباط به حتى ولو كان مرتبطا.

الأنبوبة	المادة المضافة	كثافة اللون +++،++،+
أ	مقياس	
ب	تربسين	
ج	ثلاثي كلوروحمض الخليك	
د	Phenylthiourea	

5.3.4.3. إختبار خصوصية مادة التفاعل لإنزيم بولي فينول أكسيديز:

1- حضر 3 أنابيب (أ ،ب ،ج)
2- أضف 10 قطرات من المستخلص الإنزيمي لكل أنبوبة
3- أضيف مايلي:

أنبوبة (أ):

أضف 15 قطرة من محلول الكاتيكول

أنبوبة (ب):

أضيف 15 قطرة من محلول الفينول

أنبوبة (ج):

أضيف 15 قطرة من هيدروكينون

4- رج الأنابيب بخفه وضعها في حمام مائي 37 ^{o}م
5- افحص الأنابيب بعد 5 دقائق وبعد 10 دقائق ثم سجل لون كل أنبوبة

التركيب الكيميائي للثلاث مركبات متقاربة

OH
OH

Catechol

OH

Phenol

OH
HO
OH

Hydro quinone

المادة الأساس	كثافة اللون +++،++،+
	10 دقائق
كاتيكول	
فينول	
هيدروكينون	

5.3.4.4. إختبار تأثير درجة الحرارة على النشاط إنزيم بولي فينول أكسيديز:

1- حضر 3 أنابيب (أ ، ب، ج)
2- أضيف 15 قطرة من المستخلص الإنزيمي وضعها في حمام مائي لمدة 10 دقائق عند درجات مختلفة

أنبوبة (أ) عند صفر درجة مئوية "وعاء به ثلج"

أنبوبة (ب) عند 37 ^{o}م

أنبوبة (ج) عند 70 ^{o}م

3- أضيف 15 قطرة من محلول الكاتيكول في كل أنبوبة
4- رج كل أنبوبة بخفه و بسرعه أعدها إلى الحمام المائي الخاص بها
5- انتظر 15 دقيقة ثم افحص كل أنبوبة بدون إخراجها من حمامها المائي وسجل ملاحظاتك على اللون في الجدول الخاص بالنتائج.

النتائج:

درجة الحرارة ^{o} م	كثافة اللون +++،++،+
0	
37	
70	

سؤال : في أي الحالتين وجدت أن الإنزيم غير نشط ؟ ولماذا ؟

6.الكربوهيدرات (1)

6.1.مقدمة:

الكربوهيدرات هي مركبات عضوية الدهيدية أو كيتونية متعددة الهيدروكسيل أو التي تعطي عند تحللها مائيا ألدهيدات أو كيتونات عديدة الهيدروكسيل.

صيغتها الجزيئية هي $(CH_2O)n$ وهي تتكون من عناصر

الكربون (**C**) والأكسجين (**O**) والهيدروجين (**H**) وبعضها يحتوي

على النيتروجين (**N**) والفوسفات (**P**) والكبريت (**S**)

6.2.وظيفة الكربوهيدرات:

1- مخزن للطاقة على هيئة جليكوجين أو نشا .
2- مصدر للكربون في عملية تكوين المكونات الخلوية.
3- مصدر للطاقة من خلال أكسدة الجلكوز
4- لها وظائف بيولوجية أخرى مهمة داخل الخلية.

6.3.تصنيف الكربوهيدرات :

(1) **سكريات أحادية:** هي أبسط أنواع الكربوهيدرات وهي الوحدات البنائيه للسكريات الثنائية و العديدة، يرمز لها بالصيغة الجزيئية $C_n(H_2O)n$ و تصنف إلى قسمين منها سكريات الدهيدية مثل الجلوكوز– سكريات الكيتونية مثل الفركتوز.

Keto group
D-Fructose
Ketohexose

Aldehyde group
D-Glucose
Aldohexose

(2) **سكريات ثنائية:** هي ناتجه عن اتحاد جزيئين من السكريات الأحادية وأهمها السكروز والمالتوز واللاكتوز.

Glucose Fructose

Sucrose

Galactose Glucose

Lactose

Glucose Glucose

Maltose

(3) **السكريات المتعددة (Oligosaccharids):** تشمل السكريات التي تنشأ من اتحاد (3-10) وحدات من السكريات الاحادية

Glucose + Glucose + Fructose

Raffinose

(4) **السكريات العديدة (Polysaccharids)** : وهي ناتجة من اتحاد عدد كبير من الجزيئـات السكريات الاحاديـة يـربط بينهـا روابط جلايكوزيدية مثل النشا (الاميلوز و الاميلوبكتين) و الجليكوجين والسليلوز .

Amylose

Amylopectin

Cellulose

6.4.الاختبارات العامة للكربوهيدرات:

1-اختبارات وصفية للكربوهيدرات

الهدف من الاختبارات:

1-التعرف على الكربوهيدرات كمواد مختلفة عن اللبيدات والبروتين.

2-التمييز بين السكريات المختزلة وغير المختزلة.

3-التمييز بين السكريات الاحادية والثنائية والعديدة.

4-التمييز بين السكر الالدوزي والسكر الكيتوزي.

5-التمييز بين السكريات الاحادية الخماسية (البنتوزات) والسكريات الأحادية السداسية (الهكسوزات).

6.4.1.اختبار الذوبانية

تذوب السكريات الأحادية و الثنائية في المحاليل المائية نظرا لإحتوائها مجموعات قطبية مثل الهيدروكسيل التي تستطيع تكوين روابط هيدروجينية مع الماء بينما السكريات العديدة فهي إما ضئيلة أو عديمة الذوبان وذلك بسبب كبر وزنها الجزئي و طول السلاسل المكونة لها و درجة تفرعها.

يمكننا من خلال التجربة التمييز بين السكريات الأحادية والثنائية من جهة والسكريات العديدة من جهة أخرى.

النظرية العلمية للاختبار

السكريات الأحادية والثنائية قابلة للذوبان في الماء أما السكريات العديدة فنظراً لكبر جزيئاتها فإنها شحيحة الذوبان أو عديمة الذوبان في الماء وإذا ذابت فإنها تكون محاليل غروية وتظهر معكرة نوعاً ما.

الأدوات و المواد:

- محاليل مواد سكرية أحادية (جلوكوز- فركتوز-الرايبوز)
- محاليل مواد سكرية الثنائية (سكروز- لاكتوز- المالتوز)
- محاليل مواد سكرية متعدده (النشا)
- أنابيب - ماسك- ماصة.
- حمام مائي

طريقة العمل:

اختبر ذوبانية كل مادة على حدة وذلك برج كمية قليلة من المادة مع الماء البارد أولاً ثم مع الماء الساخن.

دون ملاحظاتك في الجدول التالي وقارن بين درجة ذوبانية المواد في الماء البراد والساخن.

النتائج:

	الأنبوبة	إذابة في ماء بارد	إذابة في ماء ساخن
سكريات أحادية	جلوكوز		
	فركتوز		
	رايبوز		
سكريات ثنائية	سكروز		
	مالتوز		
	لاكتوز		
سكريات عديدة	نشا		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

....

الأسئلة:

لماذا تكون السكريات العديدة محاليل غروية؟

....

....

6.4.2.اختبار موليش

يعتبر اختبار مميز للكربوهيدرات لتمييزها عن اللبيدات والبروتين(اختبار عام لجميع الكربوهيدرات). يعطي هذا الاختبار نتيجة إيجابية عبارة عن لون بنفسجي مع جميع الكربوهيدرات.

النظرية العلمية للاختبار

عند إضافة أحماض مركزة علي السكريات يتم نزع 3 جزيئات ماء من ثلاث مجموعات هيدروكسيل من السكر ويتكون مركب الدهيدي حلقي تتفاعل مجموعة الألدهيد فيه مع الكثير من المركبات العطرية كمركب ألفا نافثول الكحولي فتنتج مركبات ملونة تستخدم للتعرف على وجود السكريات و تقديرها كمياً.

ينتج الفورفورال من السكر الخماسي وهيدروكسي ميثيل فورفورال من السكر السداسي ويمكن لكل منهما أن يتفاعل مع الفا-نافثول حيث يتكون مركب أحمر بنفسجي يظهر كحلقة بين سطحي الانفصال.

الأدوات و المواد:

- حمض الكبريتيك المركز
- محلول5% الفا-نافثول (50جم/لتر مذاباً في الكحول (ايثانول) (حديث التحضير)
- محاليل بعض الكربوهيدرات.
- ماصة
- أنابيب اختبار
- ماسك أنابيب

طريقة العمل:

1. ضع في أنبوبة الاختبار 2 مل محلول السكر
2. اضف 5 نقاط من محلول5 % ألفا-نافثول
3. أضيف باحتراس وببطء 2مل من حمض الكبريتيك المركز على جانب الأنبوبة (مع عدم الرج.)

بحيث تتكون طبقتان. يشغل حمض الكبريتيك الطبقة السفلية للخليط الموجود بالإنبوبة و تتكون حلقة بنفسجية اللون عند الجدار الفاصل بين الطبقة الحمضية و الطبقة السكرية تنتشر هذه الطبقة عند رج الأنبوبة ليتلون الخيط كله باللون البنفسجي.
تعتمد درجة اللون على التركيز المادة السكرية المختبرة.

النتائج:

	الأنبوبة	**الملاحظة**	**الإستنتاج**
سكريات أحادية	جلوكوز		
	فركتوز		
	رايبوز		
سكريات ثنائية	سكروز		
	مالتوز		
	لاكتوز		
سكريات عديدة	نشا		

مناقشة النتائج:

....

....

....

..

الأسئلة:

لماذا تعطي جميع السكريات نتيجة ايجابية مع اختبار موليش؟

....

....

....

....

هل لاحظت سخونة في الأنبوبة عند نهاية التجربة مع أنك لم تقم بتسخينها ! ماهو تعليلك ؟

....

....

....

6.4.3.الاختبارات اختزالية

تقسم السكريات الي سكريات مختزلة او غير مختزلة، فاذا و جدت مجموعة كربونيل حرة سميت بالسكريات المختزله اما اذا ارتبطت تلك المجموعة بمادة أخرى و أصبحت غير حرة (مثل السكروز) فقدت صفاتها الإحتزالية.

وتتضمن الاختبارات : أختبار بندكت و اختباربارفويد

6.4.3.1.اختبار بندكت:

التمييز بين السكريات المختزلة (الجلوكوز- الفركتوز- المالتوز-اللاكتوز -الريبوز -الارابينوز) وغير المختزلة (السكروز).

نظرية العلمية الاختبار:

يتكون محلول بندكت من كبريتات النحاس وقلوي ضعيف هو كربونات الصوديوم حيث يتكون راسب أزرق من هيدروكسيد النحاس، لذلك يضاف محلول سترات الصوديوم التي تذيب الراسب ويتكون محلول رائق هو متراكب سترات النحاس الثنائي. ويختزل هذا المتراكب في وجود سكر مختزل إلى أكسيد النحاسوز الأحمر حيث يظهر بشكل راسب أحمر أو برتقالي. والسكريات المختزلة هي تلك التي تحتوي على مجموعة كربونيل حرة (الالدهيد CHO أو الكيتون C=O) وتوجد هاتان المجموعتان في الصيغ ذات السلسلة المفتوحة أما في الصيغ الحلقية فإن هذه المجموعات المختزلة تظهر بتحول التركيب الحلقي إلى التركيب ذات السلسلة المفتوحة أثناء التفاعل.

```
H — C=O                                                  NaO — C=O
H—C—OH                                                   H—C—OH
HO—C—H                                                   HO—C—H
H—C—OH    + CuSO4    ——Na2CO3 (سترات الصوديوم)——>  Cu2O +  H—C—OH
H—C—OH                               (أكسيد نحاسوز)      H—C—OH
CH2OH                                                    CH2OH
D – غلوكوز                                               غلوكونات الصوديوم
```

الأدوات و المواد:

- محاليل سكرية مختلفة (1 جرام %)
- محلول بندكت (كبريتات نحاس + بيكربونات صوديوم+ سترات صوديوم)
- حمام مائي مغلي.
- أنابيب اختبار و ماسك.
- ماصة.

طريقة العمل:

1. ضعي 2 مل من كاشف بندكت انبوبة الاختبار
2. أضف لكل انوبة 1 مل من محلول السكر ورج المزيج
3. نضعها في حمام مائي مغلي لمدة دقيقتين .
4. . أترك الأنبوبة لتبرد ببطء (تجنب التبريد بماء الصنبور). لا حظ تكون راسب أحمر أو برتقالي أو أخضر وذلك حسب كمية السكرالمختزل. في غياب السكريات المختزلة يتكون لون أسود من أكسيد الحديديك.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
جلوكوز		
فركتوز		
مالتوز		
سكروز		
النشا		

مناقشة النتائج:

....

....

الأسئلة:

اي من السكريات تختزل محلول بندكت ؟ ولماذا ؟ اذكر مثال علي ذلك؟

....

اي من السكريات لا تختزل محلول بندكت ؟ ولماذا ؟ اذكر مثال علي ذلك؟

....

بالرغم من أن السكروز والمالتوز كلاً منهما سكر ثنائي إلا أن أحدهما مختزل والآخر غير مختزل. كيف تفسر ذلك؟!

....

....

6.4.3.2.اختبار بارفويد Barfoed's Test :

اختبـار يميزالسـكريات الأحاديـه مختـزل (الجلوكـوز- الفركتـوز- الارابينـوز- الريبـوز) وسـكريات الثنائيـه المختزلـه (المـالتوز- اللاكتوز).

النظرية العلمية للاختبار:

في هذا الاختبار يتم الاختزال في وسط حمضي بدلاً من الوسط القلوي كما هو الحال في اختبار بندكت واختبار حمض البكريك. وفي هذه الظروف تستجيب السكريات الأحادية المختزلة للاختبار أسرع من السكريات الثنائية المختزلة حيث تتفاعل السكريات الثنائية المختزلة ببطء. ويتكون كاشف بارفويد من محلول خلات النحاس في حمض الخليك.

لكن يلاحظ انه عند زيادة التسخين فوق خمس دقائق فان السكريات الثنائية سوف تتحلل بفعل الحرارة الي سكريات أحادية وبذلك تعطي نفس النتيجة .

$$R\text{-CHO} + 2\,Cu^{+2} + 2\,H_2O \longrightarrow R\text{-COOH} + Cu_2O + 4\,H^+$$

Aldehyde — Carboxyl

راسب أحمر من أكسيد النحاس في قاع الأنبوب

الأدوات والمواد:

- محاليل سكرية.
- كاشف بارفويد (يذاب 13.3جم من خلات النحاس في 200مل ماء ثم يضاف 1.8من حمض الخليك).
- حمام مائي مغلي
- أنابيب اختبار و ماسك
- ماصة

طريقة العمل:

1. أضف حوالي 1مل من محلول السكر
2. إلى حوالي 2مل من كاشف بارفويد
3. . سخن لدرجة الغليان مدة 2-3 دقائق واترك المحلول ليبرد.

لاحظ تكون لون أحمر طوبي في وجود السكر المختزل.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
جلوكوز		
فركتوز		
مالتوز		
سكروز		
النشا		

مناقشة النتائج:

....

....

الأسئلة:

لماذا يجب عدم ترك الأنابيب تغلي لمدة تتجاوز خمس دقائق؟

....

ما وجه الاختلاف بين اختبار بندكت و اختبار بارفويد؟

....

....

ما ا لفرق بين السكريات التي **أظهرت نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار و تلك التي لم تُظهر ؟**

....

6.4.3.3.اختبار بايل(Bial's Test) :

يستخدم هذا الإختبار التمييز بين السكريات الأحادية الخماسية (البنتوزات مثل الارابينوز والريبوز) والسكريات الأحادية السداسية (الهكسوزات مثل الجلوكوز والفركتوز).

النظرية العلمية للاختبار:

إذا سخن محلول البنتوز مع حمض الهيدروكلوريك المركز لمدة قصيرة يتكون الفورفورال وهذا يتفاعل مع الاورسينول في وجود أيونات الحديديك حيث يتكون لون أخضر مزرق.

يلاحظ أن التسخين لمدة طويلة قد يحول دون تحول الهكسوز إلى هيدروكسي ميثيل فورفورال الذي يتفاعل مع الاورسينول.

الأدوات والمواد:

- كاشف الاورسينول (يذاب 1.5جم من الاورسينول في 500مل من حمض الهيدروكلوريك المركز ثم يضاف 20 قطرة من محلول 10% كلوريد الحديدك)
- مواد سكرية.
- أنابيب اختبار مع ماسك
- حمام مائي مغلي
- ماصة

طريقة العمل:

1. أضف حوالي 1 مل من محلول السكر
2. 2.5 مل من كاشف الاورسينول في أنبوبة اختبار
3. سخن لمدة 7 دقائق في حمام مائي مغلي . إذا تكون لون أخضر مزرق فإن الكشف موجب.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
رايبوز		
جلوكوز		
فركتوز		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ماهي السكريات التي تتفاعل مع كاشف بايل؟

....

....

ماهو المركب الذي يتكون خلال التفاعل والذي بدوره يتفاعل مع كاشف بايل؟

....

....

6.4.3.4.اختبار سلفانوف:

يستخدم هذا الإختبار للتمييز بين السكريات الأحادية الالدهيدية (الجلوكوز) والسكريات الأحادية الكيتونية (الفركتوز) أو على السكريات التي تعطي سكريات كيتونية بالتحلل المائي مثل السكروز

HOCH2 O CH2OH HCl (△) -3H2O
فركتوز
٥ – هيدروكس ميثال فورفورال
ريزورسينول
معقد أحمر كرزي اللون

النظرية العلمية للاختبار:

تختلف السكريات الكيتونية عن السكريات الالدهيدية في أنها تفقد الماء وتكون فورفورال بسهولة أكثر. و يتكثف الفورفورال مع الريزوسينول يتكون متراكب أحمراللون. وعلى ذلك يجب ألا يسخن المحلول لمدة طويلة وإلا فإن السكريات الالدهيدية تعطي اختباراً موجباً أيضاً.

المواد و الأدوات:

- كاشف سلفانوف (0.5جم ريزوسينول/لتر من حمض الهيدروكلوريك-3 عياري)
- محاليل سكرية
- حمام مائي مغلي
- أنابيب و ماسك
- ماصة.

طريقة العمل:

1. ضع 1 مل من محلول السكر في أنبوبة أختبار .
2. أضف اليها 2مل من كاشف سلفانوف
3. ضع المحلول في حمام مائي مغلي لمدة 20 دقيقة.
4. لاحظ تكون لون أحمر داكن مع السكريات السداسية الكيتونية بينما السكريات السداسية الالدهيدية تعطي لون احمر قرمزي فاتح ببطء.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
جلوكوز		
فركتوز		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ماهي السكريات التي تعطي نتيجة مع كاشف سلفانوف؟

....

....

....

....

....

7.الكربوهيدرات (2)

هناك نوعان من الكربوهيدرات:

1. كربوهيدرات بسيطة: تتكون من السكريات الأحادية فقط

2. الكربوهيدرات المعقدة: تتكون من جزء سكري وجزء اخر غير سكري مثل البروتينات أو الدهون وتسمى جلايكوبروتين او جلايكولبيد.

7.1.التركيب الحلقي للسكريات الأحادية

أثبتت الدراسات أن السكريات توجد في الصورة الحلقيةوتسمى الهيمى استيال الحلقي وأن السلسلة المفتوحة تعد ذات نسبة ضئيلة جدا في المحلولالشكل الحلقي ينتج عنه متناظرة بناء على ذرة الكربون رقم 1 في الجلوكوز الحلقي ،فإذا كانت مجموعة الهيدروكسيل إلى أسفل أو اليمين يطلق على المتناظر ألفا (α)والعكس إذا اتجهتإلى أعلى أو اليسار يطلق عليه بيتا (β).

D-α- جلوكوز (36%) — D-جلوكوز (1%) — D-β- جلوكوز (63%)

7.2.الكربوهيدرات عديدة التسكر :

هي كربوهيدرات ينتج من تحللها المائي عدد كبير من السكريات الأحادية و تتكون هذه السكريات من سلسلة طويلة جدا متفرعة او مستقيمة مرتبطة بواسطة روابط جليكوزيدية و قد تكون متجانسة أي أنها تحتوي على نوع واحد من السكريات الاحادية كالنشا أو السيلولوز ، أو تكون غير متجانسة أي أنها تحتوي علي أكثر من نوع من السكريات الاحادية كالهيبارين.

و تتحلل السكريات العديدة عموما وكذلك المتعددة و الثنائية بواسطة الأحماض القوية أو الإنزيمات التي تحلل تلك الروابط إلى مكوناتها الأحادية.

7.3.الإختبارات العملية للسكريات العديدة والثنائية

7.3.1.كشف اختبار اليود:

يستخدم هذا الإختبار للتمييز بين السكريات العديدة (النشا- الجليكوجين-الديكسترين-الانيولين) والسكريات الأخرى (الأحادية والثنائية). حيث تعطي بعض السكريات العديدة مثل النشا (أميلوز و أميلوبكتين) و الجليكوجين و الدكسترين ألوانا مميزة عند إضافة اليود اليها.

النظرية العلمية للاختبار:

يكون محلول اليود متراكبات إتزازية مع السكريات العديدة فيعطي النشا لون أزرق و السبب في ذلك أن جزئ الاميلوز يوجد على هيئة سلسلة حلزونية الشكل هذا اللون يزول بالتدفئة ويعود بالتبريد مرة أخرى و الأميلوبكتين يكون لونا بنفسجي مع اليود. ويعطي الجليكوجين لون بنيا مع اليود ويعطي الديكسترين مع اليود ألوانا تتدرج من البنفسجي الفاتح الي البني الي الأصفر تبعا لعدد وحدات الجلوكوز بجزئ الدكسترين، ولا يعطي الانيولين أي لون مع اليود. ولا تعطي السكريات الأحادية أو الثنائية نتائج إيجابية مع هذا الإختبار.

المواد و الأدوات:

- محلول اليود (أذب 0.6جم من اليود في 500مل من محلول يوديد البوتاسيوم 3%)
- محاليل سكريات عديدة النشا- الجليكوجين- الديكسترين- الانيولين
- محاليل سكريات أحادية وثنائية (جلوكوز وسكروز)
- حمض الهيدروكلوريك المخفف.
- حمام مائي.
- أنابيب اختبار و ماسك
- ماصة

طريقة العمل:

1. اضف 2مل من محلول الكربوهيدرات
2. اضف 0.5 مل من محلول اليود
3. أضفقطرة من حمض الهيدروكلوريك المخفف
4. رج جيدا نلاحظ اللون المتكون بعد ذلك سخن الانبوبة و لاحظ اللون ثم برد الأنبوبة و لاجظ اللون مرة أحرى.

النتائج:

الأنبوبة	الملاحظة	الإستنتاج
النشا		
الجليكوجين		
الدكسترين		
الإينولين		
الجلوكوز		
السكروز		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

لماذا يعطي النشا والجليكوجين نتيجة إيجابية بينما لا يعطي الجلوكوز ولا السكروز نفس النتيجة؟

....

....

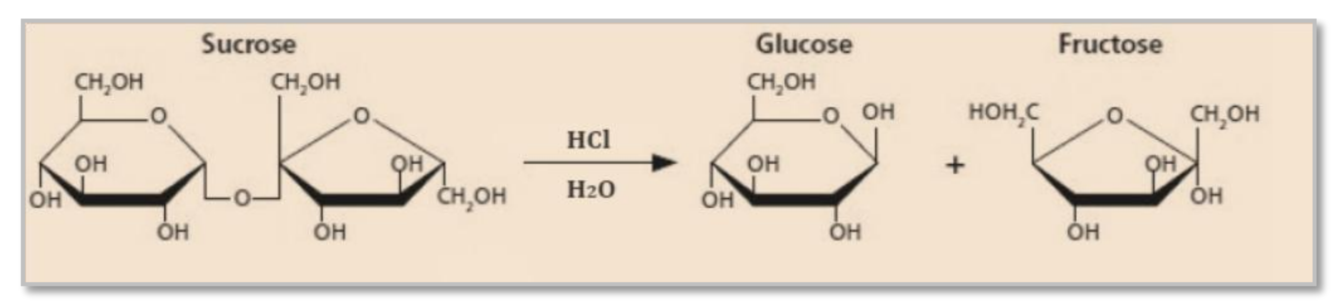
....

7.3.2.التحلل المائي للسكروز:

السكروز سكر ثنائي يتكون من ارتباط جزئ من الجلوكوز مع جزئ من الفركتوز في الموقعين 1،2 على الترتيب لذا لا توجد مجموعات مختزلة في السكروز. فعند تحلله مائيا يعطي السكرين المختزلين الجلوكوز والفركتوز فيكتسب خواصاً إختزالية.

النظرية العلمية للاختبار:

السكروز سكر ثنائي يتكون من ارتباط جزئ من الجلوكوز مع جزئ من الفركتوز في الموقعين 1،2 على الترتيب ولذا لا توجد مجموعات مختزلة في السكروز فلا يؤثر على كاشف بندكت أوعلى حمض البكريك أو كاشف بارفويد كما أنه لايكون أوزازون إلا بعد أن يتحلل السكروز إلى مكوناته.



المواد و الأدوات:

- محلول سكروز (1جم/لتر)
- حمض الهيدروكلوريك المركز.
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (5عياري).
- كاشف بندكت.
- انابيب اختبار و ماسك.
- حمام مائي مغلي.
- ماصه.

طريقة العمل:

1. أضف 5 قطرات من حمض الهيدروكلوريك المركز إلى 5مل من محلول السكروز في أنبوبة اختبار.
2. سخن لمدة 5 دقائق في حمام مائي مغلي. أترك الأنابيب لتبرد أو ضعا تحت صنبور الماء
3. أضف محلول هيدروكسيد الصوديوم قطرة قطرة حتى تحصل على محلول متعادل أو قلوي قليلاً. (يتم الكشف بواسطة ورق تباع الشمس)
4. اكشف عن الجلوكوز والفركتوز في المحلول الناتج وذلك باجراء اختبار البندكت للكشف عن الجلوكوز ثم اكشفعن الفركتوز بكاشف سلفانوف.

النتائج:

الأنبوبة	النتيجة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

مما يتكون السكروز؟

....

....

....

علل السكروز سكر غير مختزل؟

7.3.3.التحلل المائي للنشا:

سيتخدم هذا الإختبار للتعرف على طبيعة السكر الأحادي المكون لجزئ النشا وذلك بالتحلل المائي في وسط حمضي حيث يتكون الجلوكوز الذي يمكن الكشف عنه.

النظرية العلمية للاختبار:

لا يحتوي جزئ النشا العملاق إلا على عدد محدد جداً من المجموعات المختزلة ولذا فهو أساساً لا يختزل محلول بندكت ولا حمض البكريك ولا كاشف بارفويد. أما بعد التحلل المائي فيتكون الجلوكوز وهو سكر مختزل ويكون اوزازون.

المواد و الأدوات:

- محلول النشا (1%)
- حمض الهيدروكلوريك المركز
- محلول هيدروكسيد الصوديوم (5 عياري)
- محلول اليود.
- كاشف بندكت
- هيدروكسيد الصوديوم 10%
- أنابيب اختبار نظيفة.
- حمام مائي.
- ماصة.

طريقة العمل:

1. ضع 2 مل من النشا في انبوبة اختبار كبيرة
2. أضف 5 نقاط من حمض الهيدروكلوريك المركز، وسخنها في حمام مائي يغلي لمدة 15 دقيقة، ثم برد المحلول.
3. أضف كمية من هيدروكسيد الصوديوم إلى أن يصبح الوسط قاعديا
4. قسم محتوى الأنبوبة إلى أنبوبتين نظيفتين بالتساوي
5. أضف لإحدى الأنبوبتين 1 مل من محلول اليود ونلاحظ النتيجة.
6. أضف للأنبوبة الثانية 1 مل من كاشف بندكت ثم رج و سخن لمدة 3 دقائق ونلاحظ النتيجة

النتائج:

الأنبوبة	النتيجة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

ماذا ينتج من تحلل النشا؟ وكيف يمكن الكشف عنه؟

....

....

....

....

....

8. الدهون (Lipids)

8.1. مقدمة -

توجد الدهون طبيعيّا في الكائنات الحيةولها وظائف تركيبية في الخليةحيث تدخل في تركيب الغشاء الخلوي. وتعتبر الدهون مصدرا أساسيّا من مصادر الطاقة في الجسم تفوق كل من الكربوهيدرات والبروتينات.

ويمكن تعريفها بأنها مركبة عضوية غير قطبية عديمة الذوبان في الماء ولكنها تذوب في المذيبات العضوية مثل البنزين والأيثر والكلوروفوم وغيرها.

1. الأحماض الدهنية (fatty acids) :

هي الوحدات البنائية للدهون،وهي عبارة عن سلسلة هيدروكربونية (hydrocarbon chain) طويلة تحتوي في طرفها على مجموعة كربو كسيل (carboxyl group).وتنقسم الأحماض الدهنية إلى :أحماض دهنية مشبعة (saturated) وأحماض دهنية غير مشبعة(unsaturated تحتوي على روابط مزدوجة)

الصيغة العامة للأحماض الدهنية:

$$CH_3\,(CH_2)_n\,COOH$$

2. يمكن تقسم الليبيدات حسب تركيبها الكيميائي إلى :

أ-ليبيدات بسيطة (Simplelipids):

وهي إسترات الأحماض الدهنية مع الكحول مثل الجليسرول، ومن أمثلتها الدهون والزيوت(fats and oils).

ويعتبر ثلاثي اسايل الجليسرول triacyglycerol من أبسط وأكثر الدهون انتشارا وهي الصورة التي تخزن عليها الدهون ومخزن الطاقة داخل الخلية.

CH_2OH / $H-C-OH$ / CH_2OH (غليسرول) + R_1COOH / R_2COOH / R_3COOH (حموض دهنية) $\xrightarrow{-\,3H_2O}$ $H_2C-O-CO-R_1$ / $HC-O-CO-R_2$ / $H_2C-O-CO-R_3$ (ثلاثي غليسريد)

ب-ليبيدات المركبة (conjugated lipids):وهي دهون تربط مع مركبات أخرىمثل الفوسفوليبيد (phospholipids) و الجلايكوليبيد (glycolipids).

ج-ليبيدات المشتقة (derived lipids):وهي مواد توجد ذائبة في الدهون وبالرغم من أن العديد منها ليست إسترات ولكن حيث إنها توجد ذائبة في الدهون أو اشتقت من تحلل الدهون مائيا فتعتبر جوازاًأنها دهون مشتقة ومن أمثلتها الكولسترول.

8.2.الاختبارات الوصفية للدهون (Qualitative tests of lipids):

8.2.1.اختبار الذوبانية (:Solubility test)

هدف التجربة :

إثبات أن الزيوت والدهون هي مركبات تختلف في ذوبانها عن الكربوهيدرات و البروتينات نظراً لاختلاف تركيبها الكاره للماء.

النظرية العلمية للإختبار :

لا تذوب الزيوت أو الدهون في الماء نظراً لطبيعتها الغير قطبية(الهيدروفوبية)ولكنها تذوب في المذيبات العضوية كالإيثر والبنزين والكلورفورم والكحول المغلي وغيرها.

تختلف الدهون فيما بينها في قابليتها للذوبان في المذيبات العضوية المختلفة ويستفاد من ذلك في فصل خليط من الدهون عن بعضها البعض وعلى سبيل المثال لا تذوب الفوسفاتيدات (phosphtide) في الأسيتونولا تذوب السيريبروسايد (cerebroside) وكذلك السفنجومايلين (Sphingomyline) المختلقة في الايثر.

المواد والأدوات المطلوبة:

- زيت الزيتون (أو زيت بذرة القطن)-زبد- زيت الذرة
- المذيبات: حمض مخفف-قلوي مخفف-ايثانول-أيثر-كلوروفورم - أسيتون
- أنابيب اختبار
- حمام مائي
- حامل أنابيب

طريقة العمل:

1- ضع 0.5ml من الزيت في 6 أنابيب اختبار نظيفة جافه.
2- أضف كل أنبوبة على 4ml من على أحد المذيبات (الأسيتون و الكلوروفورم و الايثر و الايثانول البارد والماء).
3- رج الأنابيب جيداً ، ثم اترك المحاليل لمدة حوالي دقيقة واحدة،
4- لاحظ النتائج فإذا انفصلت إلى طبقتين يكون الزيت غير ذائب وإما إذا تكونت طبقه واحدة متجانسة شفافة يكون الزيت ذائباً في المذيب.

5- دون النتائج في الجدول

النتائج

المذيب / الليبيد	مـدى الذوبانية				
	الأسيتون	الكلوروفورم	الإيثر	الإيثانول البارد	الماء
زيت الزيتون					
زيت بذرة القطن					
زيت الذرة					
زبدة					

مناقشة النتائج:

....

....

الأسئلة:

أي المذيبات يعتبر أفضل المذيبات للدهون؟

....

....

أي المذيبات يعتبر أسوا المذيبات للدهون ؟

....

مأنواع الأحماض الدهنية الموجودة في الأغذية الشائعة الإستخدام مثل:

زيت دوار الشمس ....

زيت الزيتون...

زيت الذرة...

الزبدة..

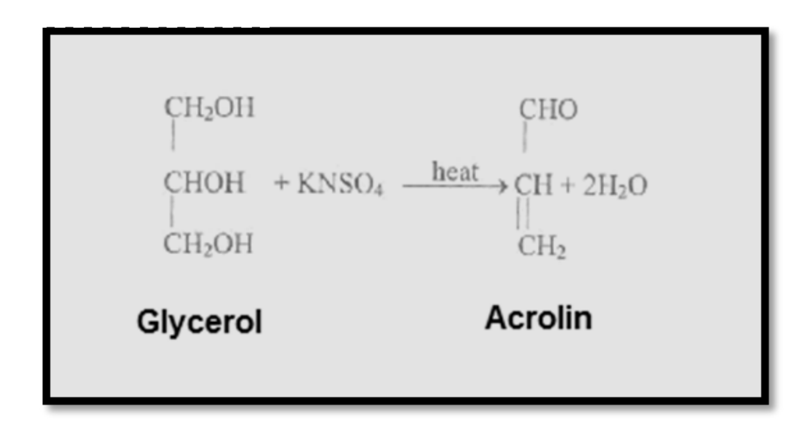
شمع النحل...

8.2.2.اختبار الاكرولين (Acrolein test) :

يستخدم هذا الإختبار للكشف عن وجود الليبيدات حيث تعطي رائحة مميزة من الأكرولين

النظرية العلمية للإختبار :

تعمل بيكبريتات البوتاسيوم $KHSO_4$ (الصلبة) على نزع جزيئين ماء (dehydration) من كل جزئ جليسرول بالزيوت أو الدهون حيث يتحول الجليسرول إلى اكرولين acrolein والذي يمكن تمييزه من رائحته النفاذة المهيجة للأغشية.



ويمكن الكشف عن وجود الدهون بواسطة صبغة Sudan IV (صبغة عامه للدهون), حيث تصبغ الدهون عند إضافتها بصبغه حمراء.

الأسئلة :

لماذا يستخدم اختبار الاكرولين كاختبار عام للزيوت والدهون ؟

....

....

هل تتوقع أن تحصل على نتيجة إيجابية فيما لو استخدمت مايلي مع توضيح السبب:

أ)حمض الأوليك أو حمض البالمتيك

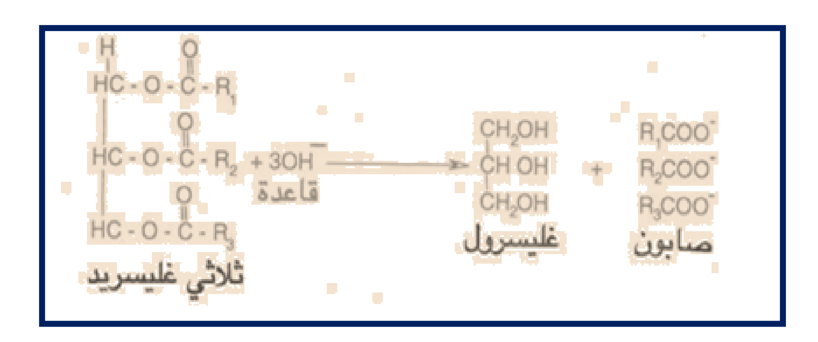
ب)شمع النحل

8.2.3اختبار التصبن Saponification test):

يهدف هذا الإختبار إلى عرفة التركيب الكيميائي للصابون وعمله كمنظف ومزيلاً للزيوت والأتربة.

النظرية العلمية للاختبار:

التصبن عبارة عن عملية تحليل الزيوت أو الدهن مائيا في وسط قلوي وينتج عن ذلك جليسرول وأملاح الأحماض الدهنية (الصابون Soap) ويمكن استخدام عملية التصبن في فصل المواد القابلة للتصبن عن المواد الغير قابلة للتصبن (التي توجد ذائبة في الدهون) ويمكن توضيح عملية التصبن كما يلي :



يمكن تعريف الصابون على انه الأملاح المعدنية للأحماض الدهنية.

والصابون قابل للذوبان في الماء ولكنه غير قابل للذوبان في الايثر. ويعمل الصابون على استحلاب الزيوت والدهون في الماء حيث أنه يعمل على تقليل الجذب السطحي للمحلول .

المواد والأدوات المطلوبة:

- أنواع من الزيوت مثل زيت الذرة, زبد ,زيت الزيتون .
- محلول KOH في الكحول (2O%KOH)
- حمام مائي(درجة الغليان)

طريقة العمل:

- ضع 2مل من الزيت في أنبوبة اختبار كبيره (أو دورق) .
- أضف 4مل من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي (يفضل إضافة قليلاً من قطع الخزف الصغيرة لتنظيم الغليان).
- اغلي المحلول لمدة 3 دقائق. بعد مضي هذه المدة تأكدمن تمام عملية التصبن، وذلك بأخذ قطرة من المحلول ووضعها في الماء فإذا انفصل الزيت دل ذلك على عدم استكمال عملية التصبن. وفي هذه الحالة استمر في الغليان حتى يتبخر جميع الكحول.
- خذالمادة الصلبة المتبقية (الصابون) وأذبها في حوالي 30مل من الماء وأحتفظ بها للاختبارات التالية.
- رج المحلول بعد أن يبرد ولاحظتكون رغوة كثيفة

النتائج:

الأنبوبة	المشاهدة	الاستنتاج

الأسئلة:

ماهو التركيب الكيميائي للصابون ؟

....

....

.ما فائدة إضافة هيدروكسيد البوتاسيوم في هذا الاختبار؟

....

....

اذكر أهم النواتج لعملية التصبن؟

....

....

فيما لو استخدمت زبدة الكاكاو فما نوع الصابون الذي سوف تحصل عليه ؟

....

....

فيما لو استخدمت أحماض دهنية بدلًا من الزيت فهل تتوقع أن تحصل على الصابون ؟

....

....

8.2.4.اختبار فصل الصابون من المحلول بالتمليح (salting out of soap):

يمكن الحصول على الصابون من محلوله وذلك بعملية التمليح (salting out) فعند إضافة كلوريد الصوديوم الصلب إلى محلول الصابون حتى التشبع ينفصل الصابون على صورة غير ذائبة ويطفو فوق السطح , وذلك لأن كلوريد الصوديوم شره لأمتصاص الماء فهو ينافس جزيئات الصابون للأرتباط مع الماء .

المواد والأدوات المطلوبة:

-الصابون(الذي تم تحضيره في التجربة السابقة)

-ملح كلوريد الصوديوم الصلب NaCl

-كاس زجاجي صغير

طريقة العمل:

ضع حوالي 10مل من الصابون في كاس،ثم أضف كميات قليلة من كلوريد الصوديوم على دفعات مع التقليب حتى يتشبع المحلول.

النتائج:

المشاهدة	الاستنتاج

مناقشة النتائج:

....

....

....

الأسئلة:

ما سبب انفصال طبقة الصابون على السطح عند إضافة الملح؟

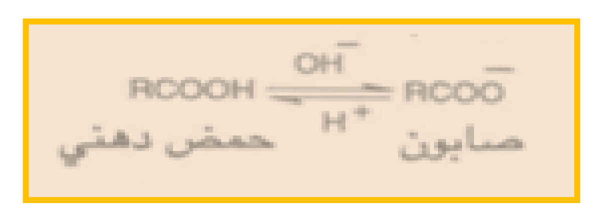
....

....

....

8.2.5.اختبار تحضير الأحماض الدهنية من الصابون(Formation of fatty acids) :

يلاحظ أن إضافة حمض مثل حمض الهيدروكلوريك إلى الصابون(الأملاح المعدنية للأحماض الدهنية)يعمل على تحلل الجليسيريدات إلى الأحماض الدهنية على صورة حرة غير ذائبة في الماء.



$$^{+}Na - O - \overset{\overset{O}{\|}}{C} - R \quad + \quad HCl \longrightarrow R - COOH \quad + \quad NaCl$$

Fatty Acids Salts (Soap) — Fatty Acid

المواد والأدوات المطلوبة:

-الصابون(الذي تم تحضيره في التجربة السابقة)

-حمض الهيدروكلوريك 10% HCl

-حمام ثلجي

طريقة العمل:

ضع حوالي 5مل من الصابون في أنبوبة اختبار، ثم ضع الأنبوبة في حمام ثلجي، ثم أضف إليها حمض الهيدروكلوريك نقطة نقطة (والأنبوبة في الحمام الثلجي) حتى تتكون طبقة زيتية طافية على السطح.

النتائج:

الانبوبة	المشاهدة	الاستنتاج

الأسئلة:

ما هو التركيب الكيميائي لطبقة الزيتية الطافية؟

....

.اكتب معادلة حمض الهيدروكلوريك مع الصابون؟

....

8.2.6.اختبار تكوين أملاح الأحماض الدهنية الغير ذائبة(Insoluble soaps) :

النظرية العلمية للاختبار:

تعمل أيونات الكالسيوم أو المغنسيوم أو الرصاص أو الحديد على ترسيب الصابون وتجعله غير ذائب في الماء حيث تحل هذه الايونات محل أيونات الصوديوم أو البوتاسيوم الموجوده في الصابون . ونظراً لإحتواء الماء العسر على كميات ملحوظة من Ca^{++}, Mg^{++} وبعض Fe^{+++} فيصعب تكون الرغوة.

صابون البوتاسيوم + كبريتات الكالسيوم = صابون الكالسيوم + كبريتات البوتاسيوم.

(يتكون راسب أبيض من استيارات أو أوليات الكالسيوم).

المواد والادوات المطلوبه:

-الصابون (الذي تم تحضيره في التجربة السابقة)

-كلوريد الكالسيوم 5% Calcium chloride $CaCl_2$

-كلوريد أو كبريتات المغنيسيوم 5% Magnesium chloride $MgCl_2$

-اسيتات الرصاص Lead acetate

-أنابيب اختبار نظيفة وجافة

طريقة العمل:

1- اضف حوالي4مل من الماء المقطر الى 2مل من الصابون في ثلاث انابيب اختبار
2- اضف لاحد الأنابيب بضع قطرات من كلوريد الكالسيوم وللانبوبة الثانية كلوريد المغانيسيوم، وللانبوبة الثالثة خلات الرصاص.

النتائج:

الانبوبة	النتيجة	الاستنتاج
1		
2		
3		

مناقشة النتائج:

....

....

....

الأسئلة :

اكتب معادلة تفاعل كلوريد الكالسسيوم مع الصابون؟

....

....

....

ماذا يحدث للصابون عند الغسيل بالماء العسر؟

....

....

....

8.2.7.اختبار خلات النحاس:

يستخدم هذا الإختبار للتميز بين الزيت أو الدهن المتعادل و الحمض الدهني المشبع والحمض الدهني غير المشبع.

النظرية العلمية للاختبار:

لا تتفاعل الزيوت أو الدهون مع محلول خلات النحاس أما الأحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة فتتفاعل مع خلات النحاس مكوناً الملح النحاس المقابل. الملح النحاسي المتكون في حالة الأحماض الدهنية الغير مشبعة فقط يمكن استخلاصه بواسطة الإيثر البترولي.

المواد:

زيت الزيتون- حمض الأولييك (حمض دهني غير مشبع)- حمض الاستيارك(حمض دهني مشبع)-إيثر بترولي- محلول خلات النحاس (5%).

طريقة العمل:

1- خذ ثلاث أنابيب اختبار وضع 1/2جم من كل مادة.
2- أضيف 3مل من الإيثر البترولي وحجم مساوي له من محلول خلات النحاس.
3- رج الأنابيب واتركها بعض الوقت.

في حالة زيت الزيتون يلحظ أن طبقة الإيثرالبترولي العليا تحتوي على الزيت مذاباً فيها ويظهر عديم اللون ويبقى المحلول المائي السفلي أزرق اللون.

وفي حالة حمض الأولييك تتلون طبقة الإيثر البترولي العليا بلون أخضر نتيجة لذوبان أولييات النحاس فيها أما الطبقة السفلى فتقل زرقتها.

وفي حالة حمض الاستيارك يلحظ أن طبقة الإيثر البترولي العليا تبقى عديمة اللون بينما يتكون راسب أخضر باهت من ستيارات النحاس في الطبقة السفلى.

النتائج:

الانبوبة	المشاهدة	الاستنتاج
زيت الزيتون		
حمض الأولييك		
حمض الستيارك		

مناقشة النتائج:

....

....

....

....

الأسئلة:

لماذا لا يتكون راسب أو لون أخضر مع زيت الزيتون في هذه التجربة ؟

....

....

....

ماذا تتوقع أن تكون النتيجة فيما لو استخدمت حمض البالمتيك أو اللينولييك؟

....

....

....

....

8.2.8.اختبار عدم التشبع (اختبار اليود):

تستخدم هذه التجربة للتعرف على طبيعة الأحماض الدهنية في الزيت أو الدهن هل هي من النوع المشبع أو غير المشبع.

النظرية العلمية للإختبار :

يتفاعل اليود (بني اللون) مع المركبات غير المشبعة وذلك بالإضافة على جانبي الرابطة المزدوجة وبذلك يتغير لون اليود.

المواد والأدوات:

زيت الزيتون، حمض الأولييك، زبد ، حمض الاستيارك (مذابة في الكلوروفورم).

محلول اليود في الكحول

أنابيب إختبار

طريقة العمل:

أضف إلى حوالي 2مل من كل من المحاليل السابقة ثلاث قطرات من محلول اليود. لاحظ ما يحدث وفسر مشاهدتك.

النتائج:

الانبوبة	المشاهدة	الاستنتاج
زيت الزيتون		
حمض الأولييك		
حمض الاستيارك		

9 .تقديرسكرالجلوكوز في الدم

يعتبرالجلوكوز (سكرالدم) من أكثرالفحوصات المخبرية أهمية ويعتبر أحدى الوسائل التشخيصية وخاصة لمرض السكري .

الجلوكوزأهم الموادالسكرية في الجسم حيث يمكن للجسم الحصول عليه من عمليات الهضم للكربوهيدرات أومن خلال تحلل الجلايكوجين المخزن في خلايا الكبد .

تستخدم الخلايا الجلوكوز كأهم مصادر الطاقة حيث يدخل في العمليات الأيضية لاستخلاص الطاقة التي يستفيد منها الجسم في استمرار العمليات الحيوية.

يرتفع مستوى الجلوكوزفي الدم عند تناول وجبات غذائية عالية في محتوى السكر , و ينخفض كذلك عند الانقطاع عن الغذاء لفترات طويلة ممايؤثر على حالة الجسم الفسيولوجية الحيوية , لذا يملك الجسم معدل طبيعي للجلوكوز في الدم يحافظ عليه , ويبلغ المعدل الطبيعي للجلوكوز في الدم حوالي 70-110 ملغم لكل ديسي ليتير في حالةالصيام أو الجوع .

يتم التحكم في ثبات المعدل الطبيعي للجلوكوز في الدم بواسطة نظام هرموني يشمل على هرمون الأنسولين الذي يفرز عند زيادة مستوى الجلوكوز في الدم , و كذلك هرمون الجلوكاجون الذي يفرزعند انخفاض مستوى الجلوكوز في الدم.

في مرض السكري (Diabetes mellitus) يكون هناك ارتفاع عالي في مستوى الجلوكوز في ا لدم و ذلك نتيجه خلل في استفادة الخلايا من الجلوكوز .

قياس مستوى الجلوكوز في الدم:

يمكن قياس مستوى الجلوكوز في الدم باستخدام الطرقالأنزيمية Enzymatic methods

أ و الطرقالكيميائية Chemical methods .

أ-الطرق الأنزيمية :

تعتبرالطرق الأنزيمية من أدق الطرق لتقدير الجلوكوز وذلك لتخصص الأنزيمات على المواد التي تعمل عليها والتفاعلات التي تحفزها وتعطي نتائج دقيقةجدا. وتعتمدعلى أكسدة الجلوكوز بواسطة أنزيم جلوكوز أوكسيديز glucose oxidase إ لى حمض الجلوكونيك gluconic acid بالإضافة إلى فوق أكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide H_2O_2 , و يعمل فوق أكسيدالهيدروجين الناتج على أكسدةالمركب-o dianisidine في وجود إنزيم البيروكسيديزperoxidase إلى مركب ملون يمكن قياس الامتصاص الضوئي له عند طول موجي 540nm.

$$D\text{-Glucose} + O_2 + H_2O \longrightarrow D\text{ – Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{Reduced Dye} \longrightarrow \text{Oxidized Dye} + H_2O$$

O- dianisidine Oxid o- dianisidine

ب- الطريقةالكيميائية :

هناك العديد من الطرق منها طريقة الاورثو- توليدين (o-toluidine)

ويتفاعل هذا المركب مع الجلكوز ليعطي اللو ن الاخضر بوجود حمض الخليك مع التسخين , ويمكن قياس أعلى أمتصاص للنواتج عند 630 نانو ميتر.

المواد: عينة دم (بلازما)

- محلول O- toluidine : يذوب 3 غم من الثيويوريا thiourea في 1900مل من حمض الخليك الثلجي ثم يضاف لها 100 مل من O- toluidine (تحفظ في زجاجه معتمه في درجة حرارة الغرفه) .
- محلول جلكوز قياسي مركز : 1 غم جلكوز لكل 100 مل من 0.1% حمض البنزويك كماده حافضه
- محلولجلكوزقياسي(Working standard (100mg/dl) glucose) : 10 مل من المحلول القياسي الاول تكمل إلى 100 مل ماء مقطر .
- أنابيب أختبار مع حامل أنابيب
- Spectrophotometer.
- حمام مائي .

طريقة العمل:

حضر5 أنابيب و علمها كالآتي

الانابيب	1	2	3	4	blank5
محلول الجلكوز القياسي	0.1 ml	0.1 ml			
عينة الدم			0.1 ml	0.1 ml	
ماء مقطر					0.1ml
O-toluidine	ml7.0 , ترج الانابيب و تغطى بورق القصدير ثم توضع في حمام مائي يغلي لمدة 10 دقائق .				

- تبرد الانابيب تحت الماء , ثم يقاس الامتصاص عند 630 نانوميتر .

النتائج :

مناقشة النتائج:

....
....
....
....

.

10.تقدير فيتامين ج (حمض الاسكوربيك) في العصير

الفيتامينات هي مركبات عضوية حيوية يحتاجها الجسم بكميات ضئيلة لأداء وظائف حيوية هامة للجسم . وهي من المركبات التي لاتصنع في جسم الإنسان ولكن يحصل عليها من الاغذية النباتية.

تلعب الفيتامينات دورا كبيرا كعوامل مساعدة للإنزيمات coenzymes تعمل على تحفيز

وتنشيط عمل الأنزيمات ,وكذلك قد توجد كجزء في التركيب الكيميائي للإنزيمات ، ولذلك نقصها يؤدي إلى اختلال في بعض الوظائف الحيوية للجسم.

أعطيت الفيتامينات رموزا حرفية لدلالة عليها مثل(A,B,C)وذلك قبل التعرف على تركيبها الكيميائي ،ولاتزال هذه الرموز مستخدمة لسهولتها.

تصنف الفيتامينات حسب ذوبا نيتها الى قسمين هما:

1. الفيتامينات الذائبة في الماءwater-soluble vitamin

وتشمل على (مجموعة فيتامينات Bوفيتامين C

2.الفيتامينات الذائبة في الدهونfat--soluble vitamin

وتشمل على فيتامين(A,D,E,K)

فيتامين ج(Ascorbic acid)

أحد الفيتامينات الذائبة في الماء , و يتواجد هذا الفيتامين بشكل اساسي في الحمضيات مثل البرتقال والليمون.

يساعد هذا الفيتامين على امتصاص الحديد من الامعاء وكذلك يساعد على تجديد الانسجة بحيث يعمل على تنشيط تكوين بروتين الكولاجين Collagen الذي يحمي الانسجة من التهتك والنزف وخاصة انسجة اللثة.

يؤدي نقص هذا الفيتامين الى ظهور اعراض مرض الاسقربوط scurvey ويتميز هذا المرض بعدم اكتمال بناء بروتين الكولاجين في الانسجة ،لذلك تظهر اعراضه بنزف اللثة وتورمها وتخلخل الاسنان وآلام في المفاصل .

ويتم التخلص من فيتامين ج عندما يؤخذ بكميات كبيرة عن طريق طرحه في البول.

*الاحتياجات اليومية من فيتامين ج في الغذاء بالملجرامات لكل يوم(mg/day

- الاطفال تحت عمر السنة 35
- الاطفال من سنة الى 10 سنوات 40
- البالغين 45

- النساء الحوامل 60
- النساء المرضعات 80

فكرة الاختبار:

يعتبر فيتامين ج عامل مختزل ،لذلك يعتمد على مبدأ تقديره اختزال الصبغة ثنائي كلوروفينول اندوفينول (DCPIP) Dichlorophenolindophenolذات اللون القرمزي في الحالة الاختزالية،وعديمة اللون في الحالة التأكسدية.

المواد و الأدوات المطلوبة:

- صبغة ثنائي كلوروفيل اندوفينولDCPIP
- تحضر باذابه 0.16 gمن الصبغة 2ليتر من الماء المقطر
- محلول فيتامين ج القياسيstandard vitamin C solution 0.04mg/ml
- يحضر باذابة 40ملغم من فيتامين ج في 1ليتر من 5 % حمض الخلِيك .
- عصير البرتقالOrange Juice

قم بعصر البرتقالة واجمع العصير ثم قدر حجمه،ثم خفف 5 مل من العصير الى 100 مل

من حمض الخل Acetic acid 5% في دورق مخروطي

- سحاحةBurette
- دورق عياري Flask

طريقة العمل:

1.ضع 5mL من الصبغة DCPIP في دورق عياري

2.عاير باستخدام فيتامين ج القياسي الى ان تحصل على محلول عديم اللون ،ثم احسب حجم المعايرة.

3.عاير مرة اخرى ولكن باستخدام محلول عصير البرتقال المخفف ،ثم احسب حجم المعايرة.

النتائج:

- حجم عصير البرتقال=........................... مل
- حجم معايرة فيتامين ج القياسي=........................مل
- حجم معايرة عصير البرتقال المخفف =...................مل

*احسبكميةفيتامينجفيعصيرالبرتقالالاصلي؟واستنتجكمبرتقالةيحتاجهاالفردلسدالاحتياجاليوميمنفيتامينج؟

مناقشةالنتائج

....
....
....
....

11. المراجع

- Abousalah, K. and Alnaser, A., 1996, Principles of practical biochemistry.
- Farid Shokry Ataya, 2007, Practical Biochemistry. AlRoshd Publisher, Riyadh, Saudi Arabia.
- Milio, F. R. and Loffredo, W. M., 1995, Qualitative Testing for Amino Acids and Proteins, modular laboratory program in chemistry, REAC 448.